

Wirkspektrum und Signaltransduktionsmechanismus von oxidierten Lipiden in
Arabidopsis thaliana

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Müller

aus

Ulm

Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

I. Einleitung.....	1
I.1 Jasmonate.....	2
I.1.1 Biosynthese der Jasmonate.....	2
I.1.2 Metabolisierung der Jasmonate.....	5
I.1.3 Signalweiterleitung der Jasmonate	7
I.2 Phytoprostane	8
1.2.1 Nomenklatur und Synthese der Phytoprostane.....	8
1.2.2 Vorkommen von Phytoprostanen	11
I.3 Biologische Aktivität von Oxylipinen in Pflanzen	11
I.4 TGA-Transkriptionsfaktoren	14
I.5 Protein-Protein-Interaktionspartner der TGA-Transkriptionsfaktoren.....	15
I.6 Zielsetzung.....	16
II. Material und Methoden	18
II.1 Chemikalien, Enzyme.....	18
II.1.1 Spezielle Chemikalien.....	18
II.1.2 Antibiotika	19
II.1.3 Enzyme und Puffer	19
II.1.4 Proteinmarker	19
II.1.5 Säulenmaterial für die Proteinreinigung	19
II.1.6 Andere Reagenzien, Materialien und Kits.....	19
II.1.7 Laborgeräte	20
II.2 Nährmedien.....	20
II.2.1 Bakterienmedien	20
II.2.2 Pflanzenmedien.....	21
II.2.3 Antibiotika	21
II.2.4 Pufferlösungen	22
II.3 Versuche mit Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen.....	23
II.3.1 Pflanzenmaterial.....	23
II.3.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkultur	23
II.3.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	24
II.3.4. Assay zur Untersuchung des Wurzelwachstums.....	24
II.4 Bakterienstämme	24
II.5 Plasmide	25
II.6 Molekularbiologische Methoden	26

II.6.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
II.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	29
II.6.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
II.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten	29
II.6.5 Herstellung kompetenter Bakterien.....	30
II.6.6 Transformation von Bakterien	30
II.6.7 Identifizierung transformierter Bakterien-Kolonien „Colony Screen“	30
II.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA	31
II.6.9 Herstellung von Glycerinkulturen	32
II.6.10 Quantifizierung von DNA bzw. RNA	32
II.6.11 Sequenzierung von DNA-Sequenzen.....	32
II.6.12 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	33
II.6.13 Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial	33
II.6.13.1 RNA-Präparation mit der TRIzol-Methode	33
II.6.13.2 RNA-Präparation mit dem <i>RNeasy-Plant Mini Kit</i>	34
II.6.14 Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA	34
II.6.15 RNA-Transfer (Northern-Blot)	34
II.6.16 Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten.....	34
II.6.17 Radioaktive Hybridisierung	35
II.6.18 Affymetrix-Microarray.....	35
II.6.19 Gateway-Klonierung	36
II.6.20 Quantitative Real-Time PCR	36
II.7 Proteinbiochemische Methoden.....	39
II.7.1 Proteingehaltsbestimmung	39
II.7.2 SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
II.7.3 Färbung von Polyacrylamidgelen	40
II.7.4 Reinigung von rekombinanten GST6his, OPR1his und OPR3his	40
II.7.5 Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität mit CDNB	41
II.7.6 Assay zur Überprüfung der PPA ₁ -und OPDA-Reduktaseaktivität.....	41
II.8 PEG-Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten	42
II.9 Testsubstanzen	43
II.9.1 Oxylipine	43
II.9.1.1 12-Oxo-Ohytodiensäure (OPDA)	43
II.9.1.2 Jasmonsäure (JA)	43

II.9.1.3 Phytoprostane	43
II.10 Analytische Methoden	44
II.10.1 Analytische HPLC-Trennung von Oxylin-Glutathion Addukten	44
II.10.2 Nachweis der Oxylin-Glutathion-Addukte aus pflanzlichem Material	44
II.10.2.1 Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i>	44
II.10.2.2 Infiltration und Ernte des Pflanzenmaterials	45
II.10.2.3 Bestimmung der Oxylin-Glutathion-Addukte	45
II.10.2.4 Herstellung der Referenzsubstanzen von PPA ₁ - und OPDA-Glutathion-Addukten.....	45
II.11 Nachweis der Oxylin-vermittelten Expressionsaktivität	46
II.11.1 Das Luciferasesystem	46
II.11.2 Bestimmung der Expressionsaktivität mittels der <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>gst6::LUC</i> Reportergerlinie	46
III. Ergebnisse.....	48
III.1 Biologische Aktivität von Phytoprostanen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
III.1.1 Regulation der Genexpression	48
III.1.1.1 Zellkultur.....	48
III.1.1.2 Vergleich des Wirkprofils von PPA ₁ mit den Wirkprofilen anderer Oxyline.....	53
III.1.1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	55
III.1.2 Untersuchung der Regulation der Zellteilung am Modell der BY-2-Zellen	60
III.1.3 Hemmung des Wurzelwachstums.....	62
III.2 Signaltransduktionsmechanismen der PPA ₁ - und OPDA-vermittelten Wirkungen	64
III.2.1 Beteiligung von COI1 an der von Oxylinen vermittelten Wurzelwachstumshemmung...	64
III.2.2 Beteiligung von COI1 an der transkriptionellen Regulation	65
III.2.3 Untersuchung der Beteiligung von TGA-Transkriptionsfaktoren an der Oxylin- Signalweiterleitung	68
III.2.4 Untersuchung der Beteiligung TGA-interagierender Proteine an der TGA-vermittelten Oxylin-Signalweiterleitung	71
III.2.4.1 Untersuchung der Beteiligung von NPR1	71
III.2.4.2 Untersuchung der Beteiligung des SCL14-Proteins.....	71
III.2.5 Untersuchung des Wachstums der <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>tga2tga5tga6</i> und <i>tga1tga4</i> Mutanten.....	73
III.3. Metabolisierung der Cyclopentenone PPA ₁ und OPDA.....	74
III.3.1 Inaktivierung von PPA ₁ und OPDA durch Oxidoreduktasen.....	75
III.3.1.1 Induktion von Oxidoreduktasen durch PPA ₁ und OPDA	75

III.3.1.2 Reinigung von OPR1his- und OPR3his-Proteinen.....	76
III.3.1.3 Assay zur Überprüfung der PPA ₁ - und OPDA-Reduktaseaktivität.....	77
III.3.1.4 Identifizierung der Reaktionsprodukte der Oxidoreduktasen OPR1 und OPR3.....	79
III.3.2 Inaktivierung von PPA ₁ und OPDA durch Glutathion-S-Transferasen.....	81
III.3.2.1 Nicht-enzymatische Konjugation von Glutathion an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen	81
III.3.2.2 Enzymatische Konjugation von Glutathion an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen	84
III.3.2.2.1 Reinigungsstrategie	84
III.3.2.2.2 Klonierung eines neuen GST6 Expressionsvektors.....	84
III.3.2.2.3 Reinigung von GST6his	84
III.3.2.3 Untersuchung der enzymatischen Addition von Glutathion an PPA ₁ und OPDA.....	85
III.3.2.4 <i>In vivo</i> Akkumulation der Glutathion-Addukte in <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
III.3.3.1 Untersuchung der Lokalisation von GST6	89
III.3.3.1.1 Klonierung eines GST6 Lokalisationsvektors	89
III.3.3.1.2 Subzelluläre Lokalisation der GST6	90
III.4 Analyse der biologischen Aktivität von Oxylipinen mittels Reportergermlinien.....	91
III.4.1 GST6:LUC-Reportergermlinie	92
III.4.2 Biologische Aktivität der Oxylipine PPA ₁ und OPDA.....	92
III.4.3 Biologische Aktivität der reduzierten Verbindungen	93
III.4.4 Herstellung von GATEWAY-Konstrukten zur Generierung weiterer Reportergermlinien.....	95
III.4.4.1 Klonierungsstrategie zur Gateway-Klonierung.....	95
IV. Diskussion.....	96
IV.1 Biologische Aktivität von Jasmonaten und Phytoprostanen	96
IV.2 Phytoprostan-vermittelte Genexpression.....	97
IV.3 Phytoprostan induzierte Signaltransduktion	100
IV.4 Metabolisierung der Phytoprostane	102
V. Ausblick	107
VI. Zusammenfassung.....	109
VII. Summary	111
VIII. Literaturverzeichnis.....	113

IX. Anhang.....	123
X. Lebenslauf	129
XI. Teile der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in folgenden Veröffentlichungen:	130
XII. Danksagung	131
XIII. Ehrenwörtliche Versicherung.....	132

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MeJA	Methyljasmonat
MS	Massenspektrometrie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	Phytoprostan
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

I. Einleitung

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl von vielfältigen biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Als Stress werden Umweltfaktoren bezeichnet, die Wachstum und Reproduktion beeinträchtigen (LEVITT, 1980). Beispiele für abiotischen Stress sind Hitze, Kälte, Trockenheit, Nährstoffmangel, Schadstoffe, UV-Strahlung und Verwundung. Zu den biotischen Stressfaktoren zählen Herbivore und andere pflanzliche Organismen sowie Viren, Bakterien und Pilze. Herbivore und Schmarotzerpflanzen nutzen die Pflanze als Nahrung bzw. entziehen ihr Nährstoffe. Mikroorganismen besiedeln die Pflanzen als Lebensraum und führen dadurch zu Krankheit oder Schädigung. Nach Stressexposition wird in höheren Pflanzen eine ganze Reihe an enzymatischen und nicht-enzymatischen Verbindungen gebildet, die als Oxylipine bezeichnet werden. Dabei umfasst der Begriff Oxylipine alle Oxidationsprodukte von ungesättigten Fettsäuren, die als Ausgangssubstanzen für die Oxylipinbildung dienen, wobei mindestens ein Schritt des Syntheseweges eine Sauerstoff-abhängige Oxidation darstellt. Obwohl die Oxylipine strukturell eine homogene Klasse darstellen, werden sie sowohl enzymatisch, unter anderem über den Octadekanoidweg, als auch nicht-enzymatisch durch Radikale gebildet. Die Produkte beider Reaktionswege sind als Signalstoffe in tierischen und pflanzlichen Systemen seit langem etabliert. Die bekannteste und am besten untersuchte Substanzklasse in tierischen Systemen stellen Cyclopentan(on)-Verbindungen wie z.B. die Prostaglandine dar. Die strukturell ähnlichen Cyclopentenon-Prostaglandine stellen eine funktionell eigenständige Gruppe dar. Ihr im Vergleich zu den Cyclopentanonen unterschiedliches Wirkspektrum wird unter anderem auf ihr strukturell unterscheidendes Merkmal, das α,β -ungesättigte Keton im Ringsystem, zurückgeführt (STRAUS and GLASS, 2001). Interessanterweise besitzen Oxylipine aus pflanzlichen und tierischen Systemen auffallende Ähnlichkeiten bezüglich Struktur, Biosynthese und Funktion (BLEE, 2002). Zentrale Signalstoffe bei pflanzlichen Oxylipinen, die eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen in höheren Pflanzen regulieren, sind Jasmonsäure (JA), ein Cyclopentanon sowie ihre chemisch abgeleiteten Derivate, sogenannte Jasmonate. Dabei umfasst der Begriff „Jasmonate“ alle von JA-abgeleiteten Metabolite sowie sämtliche biochemischen Vorstufen, inklusive des Vorläufermoleküls 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), ebenfalls ein Cyclopentenon (WEBER, 2002), das bereits seit 2001 von STINTZI *et al.*, 2001 als eigenständiges Signalmolekül vermutet wird.

I.1 Jasmonate

I.1.1 Biosynthese der Jasmonate

Jasmonate, mit ihrer Leitsubstanz JA, werden über den enzymatisch katalysierten Octadekanoidweg gebildet. Ausgangsverbindung für die JA-Biosynthese ist C-18 Fettsäure α -Linolensäure sowie die C-16:3 Fettsäure Hexadecatriensäure, die durch Lipasen aus Membranen freigesetzt wird (WEILER, 1998). Untersuchungen lassen auf das Vorkommen zweier unabhängiger Freisetzungswege in den Pflanzen schließen. So konnte nach Verwundung von Tomaten (*Solanum esculentum*) eine erhöhte Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivität nachgewiesen werden (NARVAÉZ-VÁSQUEZ, 1999). Ebenso wurde eine Beteiligung der Phospholipase D (PLD) an der wund-induzierten JA-Akkumulation bei *Arabidopsis thaliana* bestätigt (WANG *et al.*, 2000). Neben dieser wund-induzierten JA-Akkumulation mittels PLA₂ und PLD kann α -Linolensäure mittels der Phospholipase A₁ (PLA₁) freigesetzt werden. Diese Korrelation wurde durch die Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana dad1*-Mutante, die einen Defekt in der JA-Biosynthese in Blüten aufweist, gezeigt. Die *dad1*-Mutante kann zwar α -Linolensäure aus Membranen freisetzen, ist aber im Gegensatz zum Wildtyp nicht fähig, fertile Blüten auszubilden. Durch exogene Zugabe von α -Linolensäure oder JA lassen sich diese phänotypischen Unterschiede aufheben. Daraus lässt sich auf eine Funktion von DAD1 in der Freisetzung der α -Linolensäure aus Membranen der Antheren zur JA-vermittelten Blütenbildung schließen (ISHIGURO *et al.*, 2001). Aufgrund eines Anstieges an JA in *dad1* Blättern scheint DAD1 jedoch keine Rolle bei der wund-induzierten JA-Akkumulation zu spielen (ISHIGURO *et al.*, 2001). Dies lässt das Vorkommen weiterer an der wund-induzierten Freisetzung von α -Linolensäure plastidärer Lipasen vermuten (ISHIGURO *et al.*, 2001). Bei einer dieser vermuteten A₁ Phospholipasen handelt es sich um DGL1 (DONGLE1) (HYUN *et al.*, 2008). Die *dgl*-Mutante ist im Gegensatz zu der *dad1*-Mutante nicht männlich steril. Phänotypisch zeichnet sich die *dgl*-Überexprimierer-Mutante durch eine gehemmte, zwergenartige Wuchsform aus (HYUN *et al.*, 2008). Für die wund-induzierte Freisetzung der α -Linolensäure aus der Chloroplastenmembran scheinen die beiden Phospholipasen DAD1 und DGL1 verantwortlich zu sein (HYUN *et al.*, 2008). So konnte in quantitativen Real-Time PCR Experimenten in der *dgl* bzw. *dad1*-Mutante gezeigt werden, dass der JA-Anstieg in der frühen Phase nach Verwundung durch die Phospholipase DGL1 und der späten Phase durch DAD1 gesteuert wird (HYUN *et al.*, 2008).

Im nächsten Schritt der JA-Biosynthese wird das freigesetzte Linolenat durch eine 13 Lipxygenase (LOX) zur 13-(S)-Hydroxyperoxyoctadecatriensäure (HPOT) umgesetzt. Die gebildete HPOT kann als Substrat für mindestens sieben verschiedene Stoffwechselwege dienen und mittels einer Divinylether-Synthase, Epoxy-Synthase, Peroxygenase, Hydroperoxid-Lyase oder Hydroperoxid-Reduktase verstoffwechselt werden (FEUSSNER and WASTERNAK, 2002). Die JA-Biosynthese stellt somit nur eine von sieben Möglichkeiten der Umsetzung von HPOT dar.

In den folgenden Schritten der JA-Biosynthese wird HPOT durch die Allenoxid-Synthase (AOS) in das chemisch instabile Allenepoxid 12,13-(S)-Epoxy-9,11,15-Octadecatriensäure (EOT) (BRASH *et al.*, 1988; HAMBERG, 1988) überführt, das durch die Allenoxid-Cyclase (AOC) in das Cyclopentenon-Derivat 9(S),13(S)-12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) umgesetzt wird. Mit der sich anschließenden Reaktion von OPDA zu 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure (OPC:8) durch eine NADPH-abhängige Reduktase (OPR) (SCHALLER and WEILER, 1997) verlagert sich der Ort der Biosynthese von den Chloroplasten in die Peroxisomen. Wie der Transport der Metabolite zwischen den beiden Kompartimenten vermittelt wird ist noch unklar (LAUDERT and WEILER, 1998; FROELICH *et al.*, 2003). Von insgesamt drei Isoformen einer 12-Oxo-Phytodiensäure-Reduktase (OPR1, OPR2 und OPR3), die sowohl in Tomate (LeOPR) als auch *Arabidopsis thaliana* (AtOPR) identifiziert wurden (STRASSNER *et al.*, 2002), erwies sich lediglich OPR3 in der Lage, das für die JA-Biosynthese relevante *cis*-(+)-Enantiomer der OPDA (SCHALLER *et al.*, 2000) zu reduzieren. In der sich anschließenden β -Oxidation, die ebenfalls in den Peroxisomen abläuft (VICK and ZIMMERMAN, 1983; SCHALLER, 2001) dient OPC:8 als Substrat. Der Prozess der β -Oxidation umfasst drei enzymatisch katalysierte Schritte. Dem ersten Enzym, der Acyl-CoA-Oxidase (ACX) schließt sich ein Enzymkomplex an, der eine 2-*trans*-Enoyl-CoA-Hydratase und eine L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase enthält. Die abschließende Verkürzung der Carboxylseitenkette geschieht mittels einer 3-Keto-Acyl-CoA Thiolase (KAT) (CRUZ CASTILLO *et al.*, 2004; SCHILLMILLER and HOWE, 2005). Nach drei Zyklen der β -Oxidation wird schließlich 3(R),7(S)-(+)-7-*epi*-JA mittels einer Thioesterase freigesetzt, die im dynamischen Gleichgewicht mit der isomeren 3(R),7(R)-(-)-JA steht (WEILER, 1998; LEÓN, 1999). Betrachtet man die Konfiguration der gebildeten Jasmonate, so zeigt sich, dass während der gesamten Biosynthese die thermodynamisch ungünstigere *cis*-Konfiguration für die Seitenketten beibehalten wird, so dass ausschließlich 3(R),7(S)-(+)-7-*epi*-JA entsteht. Erst durch eine Epimerisierung in der Pflanze oder während eines Extraktionsprozesses entsteht vorwiegend 3(R),7(R)-(-)-JA. In pflanzlichen Zellkulturen beträgt das Verhältnis zwischen dem *trans*-3(R),7(R)-JA Epimer und dem *cis*-3(R),7(S) Epimer ungefähr 9 zu 1 (MUELLER, 1997).

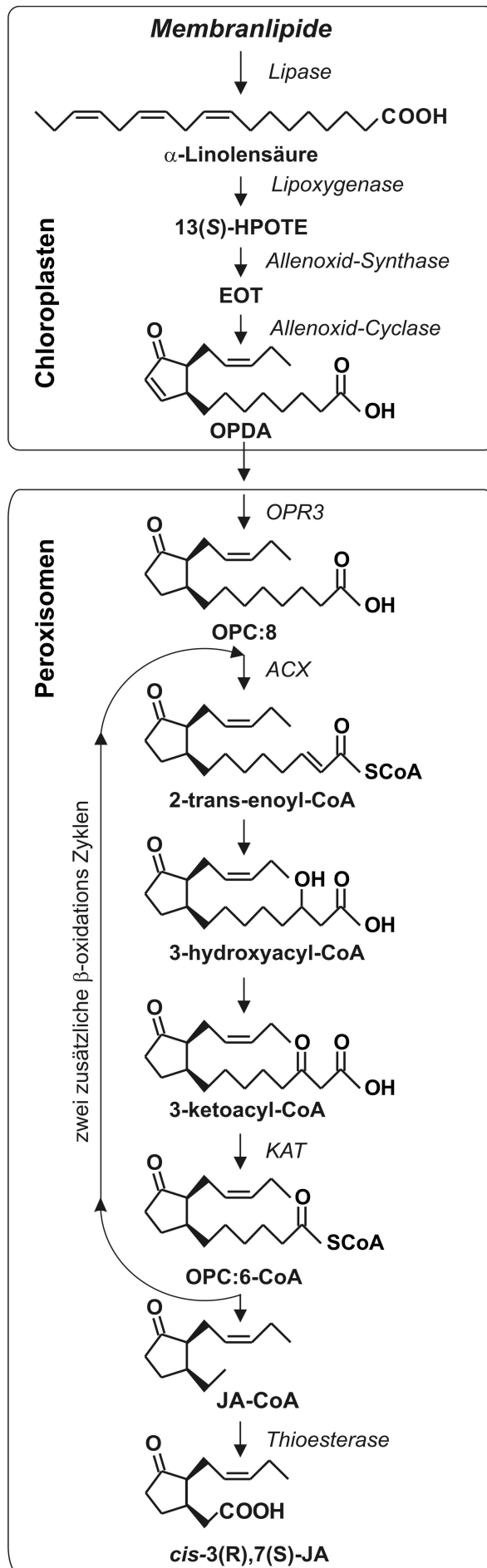


Abbildung I.1 Kompartimentierung der Jasmonsäurebiosynthese; nach Li *et al.*, (2005); modifiziert. LA(18:3): α -Linolensäure; 13(S)-HPOT: 13(S)-Hydroxyperoxyoctadecatriensäure; EOT: 12,13(S)-Epoxy-9(Z),11(E), 15(Z)-Octadecatriensäure; OPDA: 12-Oxo-Phytodiensäure; dH-OPDA (i.e., OPC:8): 10,11-Dihydro-12-Oxo-Phytodiensäure; JA: Jasmonsäure.

I.1.2 Metabolisierung der Jasmonate

Das Endprodukt des Octadecanoidweges, die JA, kann ihrerseits in nachfolgenden Modifikationsreaktionen selbst als Substrat dienen. Das Wechselspiel von Biosynthese und Metabolisierung schafft ein dynamisches System, das die Menge an JA und ihre Metabolite sensibel an den Bedarf anpassen kann. Bislang sind sieben verschiedene Metabolisierungswege durch Identifizierung der entsprechenden Metabolite bekannt. Die Identifizierung der beteiligten Enzyme gelang bisher nur teilweise (WASTERACK, 2007).

Die Methylierung von JA zu MeJA wird durch die JA-Methyltransferase (JMT) katalysiert (SEO *et al.*, 2001). Die Rückreaktion vermittelt die Methyljasmonat-Esterase (MJE) (STUHLFELDER *et al.*, 2004).

Neben dieser reversiblen Methylierung kann die JA mit Aminosäuren konjugiert werden (KRAMELL *et al.*, 1997; STASWICK and TIRYAKI, 2004). Die Konjugation mit einer Aminosäure kann, wie beispielweise bei Auxin, zu einem Wirkungsverlust (NORMANLY, 1997) oder wie im Falle der JA zu einem biologisch aktiven Aminosäure-Konjugat führen (KRAMELL *et al.*, 1997). In *Arabidopsis thaliana* ist die Aminosäure-Konjugation mit Isoleucin mit JA am häufigsten (KRAMELL *et al.*, 1997). Die zweistufige Konjugationsreaktion wird in *Arabidopsis thaliana* durch JASMONATE RESISTANT1 (JAR1) vermittelt. Im ersten Schritt wird die Carboxylgruppe von JA in einer ATP-abhängigen Reaktion adenyliert und anschließend erfolgt im zweiten Schritt die Konjugation mit einer der Aminosäuren Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe) oder Valin (Val) (STASWICK *et al.*, 2002; STASWICK and TIRYAKI, 2004).

Die JA- bzw. MeJA-vermittelte Wurzelwachstumshemmung in *Arabidopsis thaliana* (DATHE, 1981) diente in einer Reihe von Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana*-Mutanten als Marker für die Signalwirkung verschiedener JA-Derivate. In *Arabidopsis thaliana jar1*-Mutanten, die einen Defekt im JAR1-Gen tragen, ließ sich das Wurzelwachstum nicht durch Behandlung mit MeJA hemmen (STASWICK *et al.*, 2002). Natives JAR1-Protein kann JA, nicht aber weitere Jasmonate wie MeJA oder OPDA modifizieren (STASWICK *et al.*, 2002; STASWICK and TIRYAKI, 2004). Exogen appliziertes MeJA muss erst zu JA hydrolysiert und anschließend mit Ile konjugiert werden, um das Wurzelwachstum zu hemmen.

Eine weitere Modifikationsreaktion, die JA eingeht, ist die Konjugation mit der Ethylen-Vorstufe 1-Amino-Cyclopropan-1-Carbonsäure (ACC). *Arabidopsis jar1*-Mutanten, die keine JA-Aminosäure Konjugate bilden können, zeigen einen deutlich erhöhten Gehalt an JA-ACC und JA-Phe Konjugaten (STASWICK and TIRYAKI, 2004). Diese Verschiebung der JA-Derivate zugunsten von JA-ACC und JA-Phe legt die Existenz von mehr als nur einem JA-konjugierenden Enzym nahe. Exogen appliziertes JA-ACC

bewirkt jedoch im Vergleich zu JA-Ile auch eine Wurzelwachstumshemmung in der Jasmonat-insensitiven *coi1* Mutante (STASWICK and TIRYAKI, 2004). Diese Beobachtung lässt die Beteiligung des JA-ACC konjugierenden Enzyms an der Koordinierung von JA- und Ethylen-Signalwegen vermuten (STASWICK and TIRYAKI, 2004).

Tuberonsäure, die an der Kohlenstoffposition C12 hydroxylierte Form der JA, ist ein bekannter Induktor bei der Knollenbildung der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (KODA, 1991). Dieses Intermediat ist sowohl das Substrat einer enzymatischen Glykosylierung (SWIATEK *et al.*, 2004) und einer durch eine 12-OH-Sulfotransferase katalysierten Sulfatierung (GIDDA *et al.*, 2003). Die Konsequenzen von Sulfatierung bzw. Glykosylierung sind bislang nicht vollständig verstanden. Allerdings wurde aufgrund einer verminderten Expression des MeJA-induzierten Gens *Thionin 2.1* durch die sulfatierte Form der 12-OH-JA die Sulfatierung als möglicher Regulator der 12-OH-JA Menge postuliert (GIDDA *et al.*, 2003).

Weitere bisher identifizierte JA-Derivate sind *cis*-Jasmon (KOCH, 1997) und Cucurbinsäure (SEMBDNER, 1993), sowie die glykosylierten Verbindungen Jasmonyl-1- β -Glukose, Jasmonyl-1-O-Gentiobiose und Hydroxy-jasmonyl-1- β -Glukose (SWIATEK *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die enzymatisch entstandene JA durch Methylierung, Glykosylierung, Konjugation mit Aminosäuren oder Reduktion der Keto- zur Hydroxylgruppe weiter metabolisiert werden kann. Die resultierenden Derivate scheinen teils unterschiedliche, teils überschneidende Wirkspektren zu JA zu besitzen. Auch wenn das Wechselspiel von JA-Biosynthese und anschließender Metabolisierung noch nicht vollständig verstanden ist, lässt sich ein sensibel reguliertes, an den Bedarf der höheren Pflanze angepasstes System vermuten.

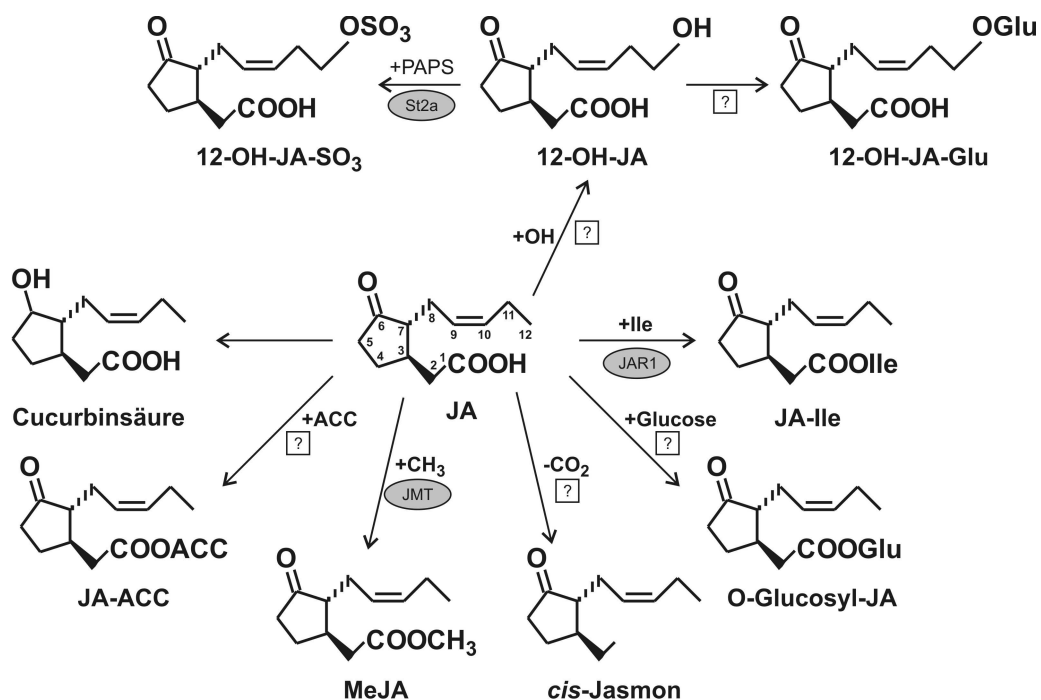


Abbildung I.2 Metabolisierung der Jasmonsäure; nach WASTERACK, (2007); modifiziert. Die Carboxyl-Seitenkette der JA kann glykosyliert, methyliert, mit Aminosäuren konjugiert, decarboxyliert oder mit 1-Amino-Cyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) konjugiert werden. Der Pentanonring kann zu Cucurbinsäure reduziert werden. Die Pentenyl-Seitenkette kann hydroxyliert und anschließend glykosyliert oder sulfatiert werden. Die beteiligten Enzyme St2a: 12-OH-Sulfotransferase; JMT: JA-Methyltransferase; JAR1: JA-Konjugat Synthetase konnten alle aus *Arabidopsis thaliana* kloniert werden.

I.1.3 Signalweiterleitung der Jasmonate

JA vermittelt physiologische Effekte bei Zellproliferation, Wurzelwachstum und Pathogenabwehr. Weitere Jasmonate, wie beispielsweise OPDA, überschneiden sich zum Teil mit diesem Wirkprofil, können aber auch gegenteilige Wirkungen besitzen. Über den genauen Mechanismus, der zur Aktivierung JA-regulierter Markergene wie *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) und *Thi2.1* (*THIONIN 2.1*) führt, wurde jedoch lange Zeit spekuliert. Zwar konnte in *Arabidopsis thaliana* eine Rolle der Jasmonate JA und OPDA bei der Pathogenabwehr nachgewiesen werden (PENNINCKX *et al.*, 1996; VIJAYAN *et al.*, 1998), eine Beteiligung von OPDA bei der Blütenbildung wurde jedoch ausgeschlossen (STINTZI and BROWSE, 2000; ISHIGURO *et al.*, 2001). Daraus ließ sich die Existenz mindestens zweier verschiedener Signalwege in *Arabidopsis thaliana* ableiten. Im Signalübertragungsweg, der über die JA vermittelt wird, spielt das *Arabidopsis* Genprodukt von *COI1* (CORONATINE INSENSITIVE1) eine Schlüsselrolle (DEVOTO *et al.*, 2005). Die Charakterisierung der *Arabidopsis coi1*-Mutante zeigte, dass diese Pflanzen sowohl einen Defekt in der Expression spezifischer JA-Markergene (u.a. *PDF1.2* und *Thi 1.2*) aufweisen als auch besonders anfällig gegenüber Pathogenen und Herbivoren sind (McCONN *et al.*, 1997; THOMMA *et al.*, 1998).

Das *COI1*-Gen kodiert für ein 66 kD leucin-reiches Protein, das eine F-Box enthält (XIE *et al.*, 1998). Zusammen mit den Proteinen S-Phase Kinase-Associated Protein1 (SKP1), Cullin (CUL1) und Rbx1 (Ring box protein) kann *COI1 in vivo* den SCF^{COI1}-Komplex ausbilden und eine E3-Typ-Ligase ausbilden (DEVOTO *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2002). Entsprechend wurde vermutet, dass das *COI1*-Protein am Ubiquitin-abhängigen Abbau eines regulatorischen Proteins, das die Expression JA-responsiver Gene reprimiert, beteiligt ist (TURNER *et al.*, 2002). Eines dieser potentiellen regulatorischen Proteine des SCF^{COI1}-Komplexes konnte vor kurzem durch die Charakterisierung und die JA-vermittelte Wirkungsweise der JAZ (JASMONATE-ZIM-DOMAIN)-Proteine identifiziert werden (CHINI *et al.*, 2007; THINES *et al.*, 2007). So konnte in einem Yeast-Two-Hybrid-System die Interaktion des regulatorischen Proteins JAI3 (JASMONATE INSENSITIVE3) mit dem nachgeschalteten Transkriptionsfaktor JIN1 (JASMONATE INSENSITIVE1) nachgewiesen werden (CHINI *et al.*, 2007). Ferner konnte gezeigt werden, dass erst durch Bindung des JA-Isoleucin (JA-Ile) Aminosäurekonjugates an das *COI1*-Protein und nicht durch die freie Säure (JA) das regulatorische Protein (JAZ-Protein) durch den SCF^{COI1}-Komplex erkannt und gebunden wird. Nach Markierung des regulatorischen Proteins (JAI3) mit

Ubiquitin wird dieses zum Abbau durch das Proteasom freigegeben und JA-gesteuerte Gene können transkribiert werden (THINES *et al.*, 2007).

Somit scheint der SCF^{COI1}-Komplex, in Anlehnung an den Auxin-vermittelten SCF^{TIR1}-Komplex, einen Ligand-spezifischen Rezeptor für JA darzustellen. Jedoch war es in diesem - analog zu SCF^{COI1} aufgebauten -Komplex (DEVOTO and TURNER, 2003) das Phytohormon (Auxin) selbst, das die Interaktion zwischen dem SCF^{TIR1}-Proteinkomplex und den Auxin -regulierten -Repressorproteinen (AUX/IAA) steuert (DHARMASIRI *et al.*, 2005).

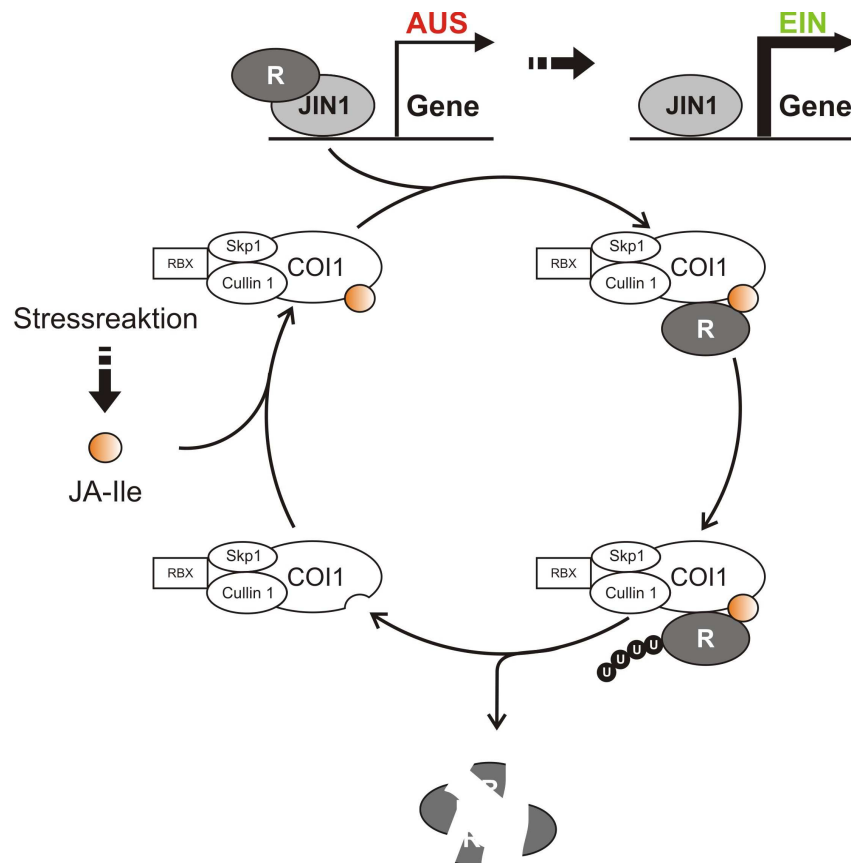


Abbildung I.3 COI1-vermittelte Signalübertragung; modifiziert nach KATSIR *et al.*, (2008). Repressorproteine (z.B. JAI3) werden mit Ubiquitin markiert und damit zum Abbau in das Proteasom freigegeben. Eine Stressreaktion aktiviert die JA-Biosynthese und führt zur Aktivierung eines Repressorproteins, das als negativer Regulator Jasmonat-responsiver Gene wirken kann. Das Repressorprotein bindet an COI1 und wird anschließend durch Markierung mit Ubiquitin im Proteasom abgebaut. U: Ubiquitin, R: regulatorisches Protein, das als negativer Regulator wirkt; nach KATSIR *et al.*, (2008), modifiziert.

I.2 Phytoprostane

1.2.1 Nomenklatur und Synthese der Phytoprostane

Seit der Entdeckung der Isoprostane im tierischen Organismus (MORROW *et al.*, 1990) weiß man, dass Prostaglandin Analoga aus mindestens dreifach ungesättigten Fettsäuren *in vivo* entstehen können. Die dreifach ungesättigte Fettsäure α -Linolensäure (C18:3) ist in Pflanzen die quantitativ bedeutendste Fettsäure (FALCONE *et al.*, 2004). Sie kann *in vitro* und *in vivo* zu Isoprostan-ähnlichen

Verbindungen von Typ I und II oxidieren, die im Vergleich zu den C20-analogen Isoprostanen aus Arachidonsäure um zwei Methylengruppen kürzer sind. Solche Verbindungen werden als Dinor-Isoprostane bezeichnet (MUELLER, 1998). Um Verwechslungen mit Dinor-Isoprostanen, die durch β -Oxidation von Isoprostanen entstehen, zu vermeiden, wurde für die aus α -Linolensäure entstandenen Dinor-Isoprostane der Name Phytoprostane vergeben (IMBUSCH, 2000). In Anlehnung an die Prostaglandin-Nomenklatur kennzeichnet der Buchstabe hinter der Abkürzung PP, für Phytoprostane, die Substitution des Cyclopentanringes und der numerische Index die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten.

Die Synthese von Isoprostanen erfolgt radikalisch durch Oxidation der α -Linolensäure. Für die Bildung dieser zyklischen Fettsäurederivate ist nur ein Strukturelement, eine 1,4,7-Oktatrieneinheit, notwendig. Die Substituenten dieser Trieneinheit sind für den Synthesemechanismus nicht relevant (Abbildung I.4). Die mögliche Synthese von PGG₂-ähnlichen Verbindungen, Phytoprostanen G₁ (PPG₁) aus α -Linolensäure über den Endoperoxid-Mechanismus ist in Abbildung I.4 dargestellt. Es entstehen dabei zwei regioisomere Strukturen, jeweils aus 16 Isomeren bestehend, die nach der Nomenklatur der Isoprostane als Typ I und II bezeichnet werden.

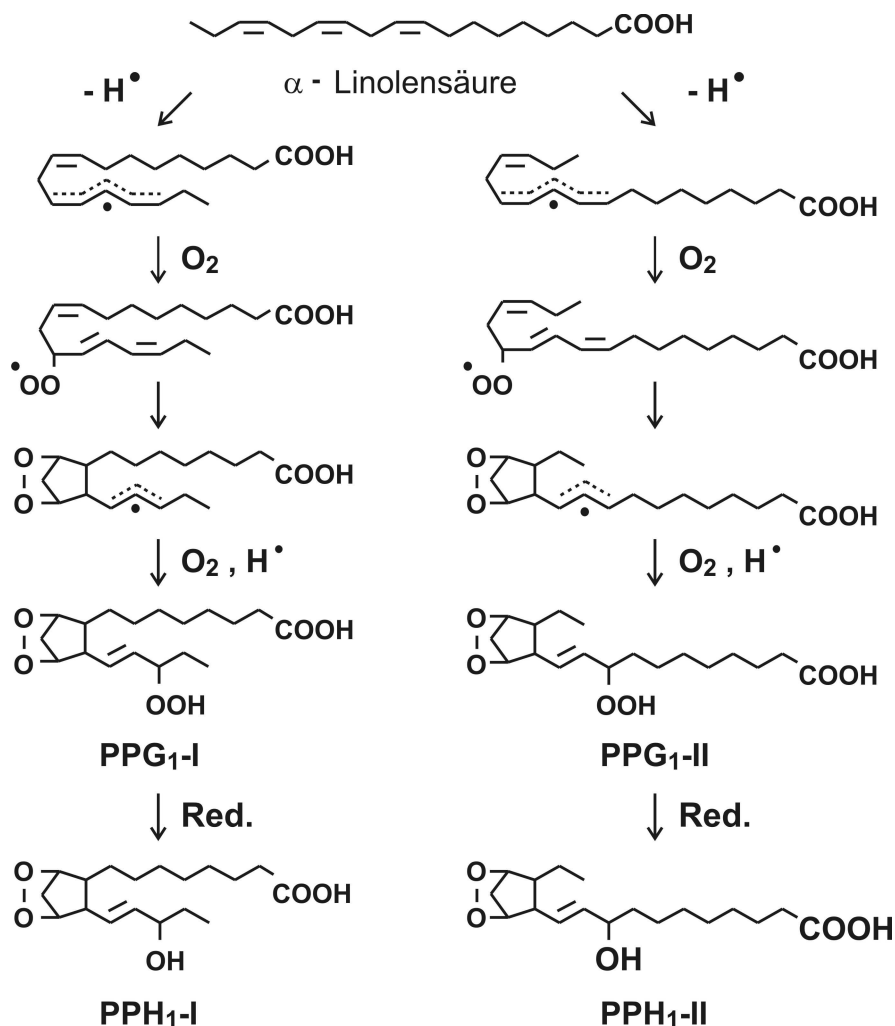


Abbildung I.4 Phytoprostan-Biosynthese nach dem Endoperoxidweg. Es entstehen H_1 -Phytoprostane, aus denen durch Umlagerung bzw. Reduktion alle weiteren Klassen an Phytoprostanen gebildet werden.

Ausgehend von dem Phytoprostan G_1 (PPG_1) können alle weiteren Phytoprostanringstrukturen auf nicht enzymatischem Wege gebildet werden (MUELLER, 1998):

(i) Reduktion der Endoperoxidgruppe des Cyclopentanrings führt zu den Phytoprostanen F_1 (PPF_1) (ii) durch Umlagerung und Reduktion der PPG_1 entstehen die Phytoprostane D_1 (PPD_1) und E_1 (PPE_1) (iii) aus Letzteren (PPE_1) kann durch Dehydratisierung Phytoprostan A_1 (PPA_1) gebildet werden und (iv) durch anschließende Isomerisierung Phytoprostane B_1 (PPB_1). Aus PPD_1 können durch Dehydratisierung Phytoprostane J_1 (PPJ_1) bzw. deoxy PPJ_1 ($dPPJ_1$) entstehen.

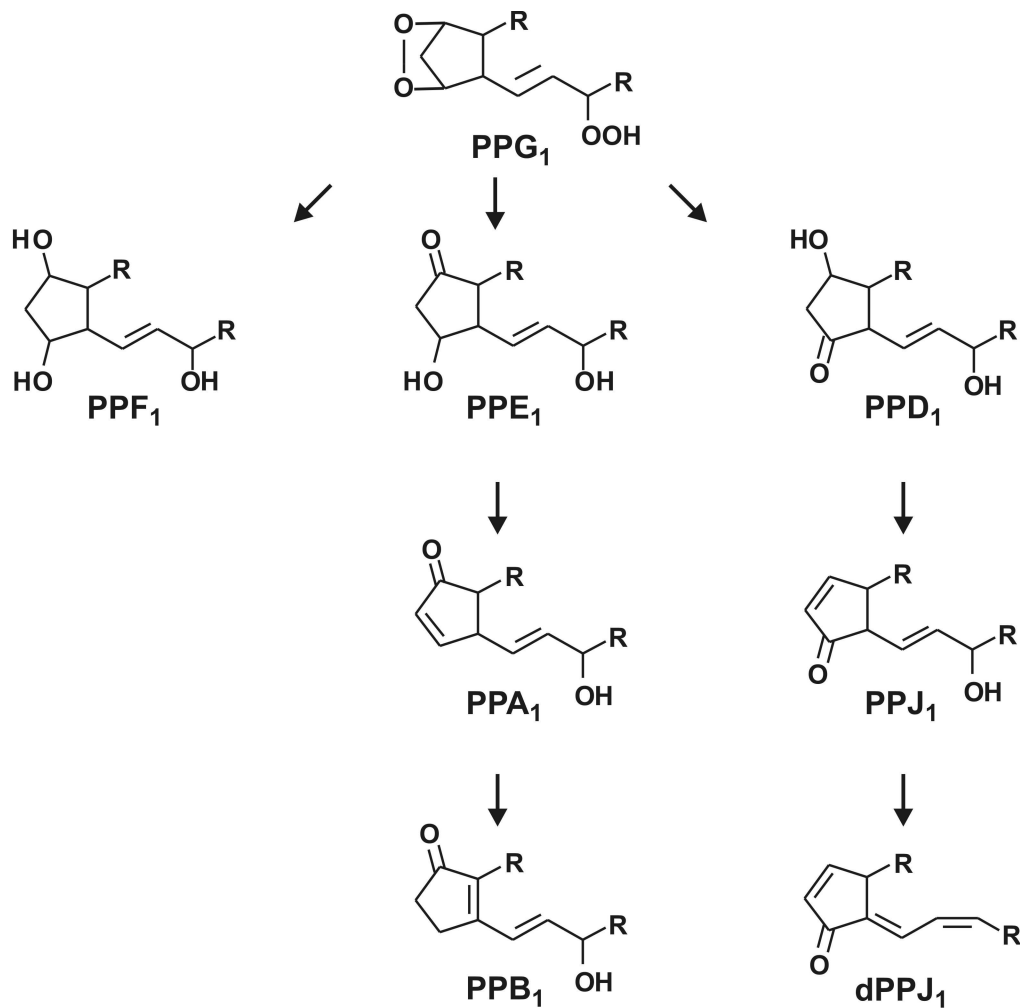


Abbildung I.5 Umlagerung der Phytoprostane G_1 (PPG_1). Aus PPG_1 entstehen F_1 -, E_1 - bzw. D_1 -Phytoprostane. PPE_1 können zu A_1 - bzw. B_1 -Phytoprostanen umgewandelt werden. Aus PPD_1 entstehen PPJ_1 bzw. $dPPJ_1$.

1.2.2 Vorkommen von Phytoprostanen

Die Bildung der nicht-enzymatischen Oxylipine wird durch freie Radikale, vor allem durch Hydroxylradikale, katalysiert. Als Bildungsort der Phytoprostane dienen vermutlich – ähnlich wie bei den tierischen Isoprostanen – primär Membranen, aus denen die Phytoprostane durch eine Lipase freigesetzt werden können. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist eine frühe Reaktion von Pflanzen nach Kontakt mit nekrotrophen, biotrophen, avirulenten oder virulenten Mikroorganismen (VRANOVA *et al.*, 2002). Am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass oxidativer Stress nach Behandlung mit tert-Butyl-Hydroperoxiden (t-BuOOH) in Tabak-Zellsuspensionskulturen die Bildung der Phytoprostane PPE₁ (PARCHMANN and MUELLER, 1998), PPA₁ und PPB₁ *in vitro* induziert (THOMA *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu der gesteigerten Phytoprostan-Konzentration wurde der Gehalt an JA durch t-BuOOH-Behandlung nicht signifikant erhöht (THOMA *et al.*, 2003). Dies ist ein erster Hinweis, dass die Bildung von Jasmonaten und Phytoprostanen über verschiedene Auslöser induziert wird (THOMA *et al.*, 2003). In weiteren Versuchen konnte die Bildung der Phytoprostane auch *in planta* nachgewiesen werden. Eine ROS-vermittelte radikalische Lipidperoxidation ist unter anderem bei Pathogenbefall zu beobachten (MUCKENSCHNABEL *et al.*, 2002). So konnte in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass die enzymatisch gebildeten Jasmonate OPDA und JA in gesunden Tomatenpflanzen ähnliche Basalkonzentrationen besitzen wie Phytoprostane (PPA₁, PPB₁, PPD₁, PPE₁, PPF₁, dPPJ₁) (THOMA *et al.*, 2003). Dies deutet auf eine konstitutive Lipidperoxidation in gesunden, unbehandelten Pflanzen hin (THOMA *et al.*, 2003). Nach Infektion von Tomatenblättern mit dem Pathogen *Botrytis cinerea* stiegen die Konzentrationen von JA und den Cyclopentenon-Phytoprostanen PPA₁, PPB₁, und PPE₁ um das ,Drei- bis Vierfache an (THOMA *et al.*, 2003). Inwieweit Cyclopentenon-Phytoprostane Mediatoren von oxidativem Stress *in vivo* darstellen oder nur Produkte der Lipidperoxidation sind, ist jedoch noch unklar (THOMA *et al.*, 2003).

1.3 Biologische Aktivität von Oxylipinen in Pflanzen

Mit der Identifizierung und Charakterisierung der *Arabidopsis opr3*-Mutante (STINTZI and BROWSE, 2000) konnte gezeigt werden, dass nicht nur JA ein zentraler Signalstoff bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen darstellt. Die *Arabidopsis opr3*-Mutante ist in der enzymatischen Umsetzung von OPDA zu JA inhibiert und zeigt einen männlich sterilen Phänotyp. Nur die exogene Zugabe von JA konnte diesen phänotypischen Unterschied aufheben (STINTZI and BROWSE, 2000), was die Bedeutung von JA bei der Pollenreifung widerspiegelt. Aus der erhöhten Empfindlichkeit der *opr3*-Mutante gegenüber Ozon folgt, dass JA - aber nicht OPDA - eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf Ozon spielt. Es wird vermutet, dass die JA-induzierte Expression von Enzymen des Ascorbat- und Glutathionmetabolismus, die an oxidativen Stressantworten beteiligt

sind, für die Ozontoleranz wichtig ist (SASAKI-SEKIMOTO *et al.*, 2005). Allerdings konnte in *opr3*-Pflanzen eine Resistenz gegenüber Larven der Mücke *Bradysia impatiens* und dem Pilz *Alternaria brassicola* (STINTZI *et al.*, 2001) nachgewiesen werden, was das Cyclopentenon OPDA als ein von JA-unabhängiges Signalmolekül in Erscheinung treten lässt. Durch die Verwendung von Microarray-Analysen an zehn Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen konnte das Genexpressionsprofil von OPDA mit dem von JA verglichen werden (STINTZI *et al.*, 2001; TAKI *et al.*, 2005). Bei dem Vergleich einer Transkriptomanalyse mit 21500 Genen waren 157 Gene lediglich durch das Cyclopentenon OPDA und 378 Gene durch das Cyclopentanon JA induziert (TAKI *et al.*, 2005). Bei der funktionellen Analyse der beiden Expressionsprofile fällt auf, dass 30 Prozent der OPDA-induzierten Gene sowohl Signalproteine als auch Abwehr- und Stressproteine kodieren (TAKI *et al.*, 2005). Demgegenüber vermittelt JA unter anderem die Expression von Komponenten der JA-Biosynthese sowie des Ascorbat- und Glutathionmetabolismus (SASAKI-SEKIMOTO *et al.*, 2005; TAKI *et al.*, 2005).

Untersuchungen von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp-Pflanzen und der *coi1*-Mutante (FEYS *et al.*, 1994) nach mechanischer Verwundung bzw. nach Befall mit Larven des Kohlweißlings (*Pieris rapae*) zeigen ein differenziertes Genexpressionsprofil (REYMOND *et al.*, 2000). Die durch Verwundung induzierten Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppe umfasst COI1-abhängige und damit putativ durch JA und OPDA regulierte Gene sowie COI1-unabhängige Gene, die andere Signale als JA für ihre Induktion benötigen (REYMOND *et al.*, 2000). Doch während die Genexpression von JA über das Signalprotein COI1 vermittelt wird (XIE *et al.*, 1998; DEVOTO *et al.*, 2005), scheint OPDA sowohl COI1-abhängige als auch COI1-unabhängige Gene zu induzieren (STINTZI and BROWSE, 2000; TAKI *et al.*, 2005; RIBOT *et al.*, 2008). Somit scheint OPDA, als Cyclopentenon, seine Genexpressionsaktivität über unterschiedliche Signalwege zu vermitteln, wobei der COI1-unabhängige Mechanismus noch unklar ist (WEBER, 2002). Untersuchungen in der *Arabidopsis aos*-Mutante zeigen, dass neben OPDA und JA noch weitere Oxylipine an der wund-induzierten Genexpression beteiligt sein müssen (TAKI *et al.*, 2005). So bleibt nach exogener Zugabe von α -Linolensäure 50 Prozent des OPDA-vermittelten Expressionsmusters in der *aos*-Mutante bestehen (TAKI *et al.*, 2005). Da diese Mutante unter Ausschluss der AOS-gesteuerten enzymatischen Lipidoxidation exogen applizierte α -Linolensäure nicht in OPDA und JA umsetzen kann, scheinen Strukturanaloga ein ähnliches Expressionsprofil wie OPDA zu vermitteln (TAKI *et al.*, 2005). Zu diesen Verbindungen gehören Malondialdehyd, Hydroxynonenal, Ketodiene und Cyclopentenon-Phytoprostane, Verbindungen, die bei der nichtenzymatischen Lipidperoxidation von Zellmembranen gebildet werden können (VOLLENWEIDER *et al.*, 2000; THOMA *et al.*, 2003). Untersuchungen in *Arabidopsis* Mutanten mit einem Defekt in der Tocopherol-Biosynthese (*vte*, Vitamin E) weisen bis drei Tage nach Keimung einen 100-fach erhöhten Spiegel an Phytoprostanen und Malondialdehyd auf. Demgegenüber ist der Gehalt an den beiden Oxylipinen OPDA und JA nicht erhöht. Transkriptom-Analysen in drei Tage alten *vte2*-Keimlingen zeigen eine verstärkte Induktion von Reduktasen und Glutathion-S-Transferasen (SATTLER *et al.*,

2006). Malondialdehyd und Cyclopentenon-Oxylipine scheinen, wie OPDA, die Fähigkeit zu besitzen, Abwehr- und Stressgene zu induzieren (ALMERAS *et al.*, 2003; SATTLER *et al.*, 2006). Es kann daher vermutet werden, dass ein Teil der biologischen Aktivität in Analogie zum tierischen System über die elektrophilen Eigenschaften des α,β -ungesättigten Ketons vermittelt wird (WEBER, 2002). Von der Arbeitsgruppe FARMER and DAVOINE, (2007) wurde postuliert, dass elektrophile Ketone Verbindungen darstellen, die ein ähnliches Muster an Genen induzieren, wobei diese Verbindungen auch leicht mit freien Thiolgruppen von cytosolischen und membrangebundenen Proteinen eine Michael-Addition eingehen können (FARMER and DAVOINE, 2007). Da diese Verbindungen somit eine potentielle Gefahr für die Zellen darstellen, können sie durch Reduktion in ein Cyclopentenon (BREITHAUPT *et al.*, 2001) oder durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden (FARMER and DAVOINE, 2007).

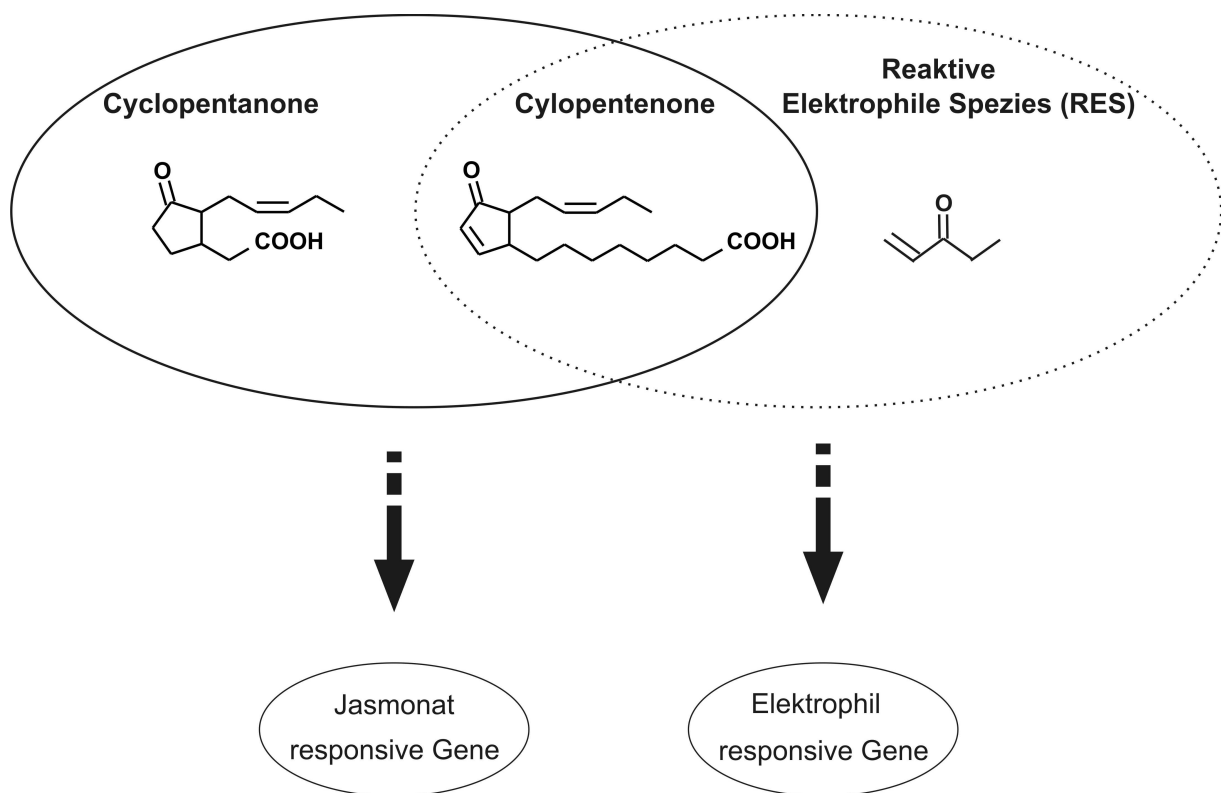


Abbildung I.6 Zwei unterschiedliche Signalfunktionen für Jasmonate. Cyclopentanone (wie Jasmonsäure) und Cyclopentenone (wie OPDA) bzw. reaktive Elektrophile (z.B. Vinylketone) regulieren in Pflanzen unterschiedliche, aber sich zum Teil überschneidende Gruppen von Genen (FARMER *et al.*, 2003). (RES = Reaktive Elektrophile Spezies).

I.4 TGA-Transkriptionsfaktoren

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert für 75 bZIP (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF)-Transkriptionsfaktoren (JAKOBY *et al.*, 2002). Diese Faktoren scheinen bei der Regulation einer Vielzahl von Prozessen, wie beispielsweise bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion und der Licht- und Stress-Signalweiterleitung, beteiligt zu sein, obgleich die Funktion von ungefähr 50 dieser bZIP-Transkriptionsfaktoren noch nicht aufgeklärt ist. Die bZIP-Transkriptionsfaktoren werden in zehn Gruppen unterteilt hierbei bilden die TGA-Transkriptionsfaktoren eine eigene Gruppe der bZIP-Proteine. Die Zuordnung zu dieser Familie begründet sich auf das Vorkommen zweier Subdomänen: dem Leucin-Zipper und einer basischen Region. Beim Leucin-Zipper findet man Leucinreste in einem Abstand von neun Aminosäuren in einer α -Helix am C-Terminus. Dieses Motiv erlaubt die Aneinanderlagerung zweier solcher bZIP Proteine in einer sogenannten „coiled-coil structure“, die durch intermolekulare Wechselwirkungen der Leucinreste vermittelt wird (LANDSCHULZ *et al.*, 1988; VINSON *et al.*, 1989). Die Ausbildung eines Dimers wird durch eine carboxyterminale Domäne stabilisiert. Eine glutaminreiche Region im Carboxy-terminalen sowie eine saure Domäne im N-terminalen Bereich verfügen zusätzlich über Aktivierungspotenzial (NEUHAUS *et al.*, 1994; PASCUZZI *et al.*, 1998). Diesem Leucin-Zipper geht ohne Ausnahme eine basische Domäne voraus, welche die DNA-Bindung vermittelt (VINSON *et al.*, 1989).

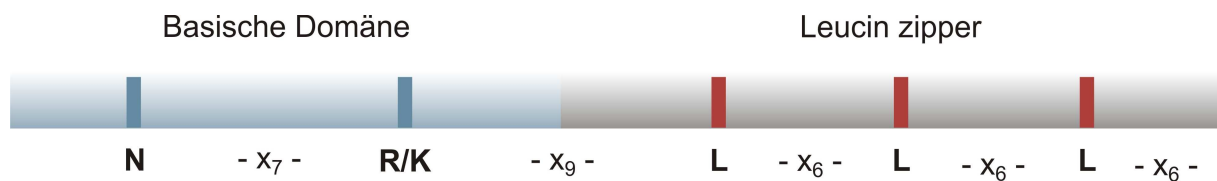


Abbildung I.7 Aufbau der TGA-Transkriptionsfaktoren; nach JAKOBY *et al.*, (2002). Die basische Domäne, bestehend aus ungefähr 16 Aminosäuren, umfasst ein N - x₇ - R/K Motif, das mit der DNA interagiert. Dieser basischen Domäne folgt in Richtung des C-Terminus im Abstand von 9 Aminosäuren (x₉) der Leucin Zipper, die eine amphipathische Helix ausbilden. N = Asparagin; R = Arginin; K = Lysin; L = Leucin.

Anhand von Sequenzhomologien konnten in *Arabidopsis thaliana* bislang zehn TGA-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die aufgrund von Aminosäurehomologien in drei Subklassen unterteilt werden können (KESARWANI *et al.*, 2007).

Zu der Subklasse I zählen TGA1, TGA1a und TGA4, zu der Subklasse II TGA2, TGA2.1, TGA2.2, TGA5 und TGA6, während TGA3 und TGA 7 die Subklasse III ausmacht (XIANG *et al.*, 1997). Das cis-Element „activation-sequence-1“ (as-1-Element), an das die TGA-Faktoren binden (KATAGIRI *et al.*, 1989), wurde ursprünglich aus dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) isoliert und charakterisiert (BENFEY *et al.*, 1989). Der DNA-Virus befällt verschiedene Nachtschattengewächse (*Solanaceae*), Kreuzblütler (*Brassicaceae*) und monokotyle Pflanzen (BENFEY *et al.*, 1989). Während der CaMV Promotor in fast allen Geweben der Pflanze nachgeschaltete Reportergene konstitutiv

aktiviert, vermittelt das isolierte *as-1-Element* konstitutive Reportergenaktivität nur in Wurzelspitzen (BENFEY *et al.*, 1989). Analoge cis-Elemente wurden später in Promotoren von Genen des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* sowie in pflanzlichen Promotoren gefunden (u.a. *GST6*).

Die Konsensussequenz des *as-1-Elements* besteht aus zwei TGACGtcg Motiven, deren Nukleinsäureabstand genau zwölf Basenpaare beträgt. Der Abstand der beiden TGACG-Sequenzblöcke ist hierbei essentiell für die Funktion des cis-Elements (ELLIS *et al.*, 1993; KRAWCZYK *et al.*, 2002).

I.5 Protein-Protein-Interaktionspartner der TGA-Transkriptionsfaktoren

In *Arabidopsis thaliana* konnte NPR1 (NONEXPRESSOR OF PR GENES) als Interaktionspartner der TGA-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (ZHANG *et al.*, 1999; DESPRES *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000). NPR1 ist ein Schlüsselregulator bei der Signaltransduktion zur Entwicklung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) in der Pflanze. Das 65 kD-große Protein enthält vier Ankyrinmotive und eine BTB/POZ (BROAD-COMPLEX, TRAMTRACK, BRICA`-BRAC/POXVIRUS, ZINC FINGER)-Domäne, die für eine Protein-Protein-Interaktion wichtig ist (CAO *et al.*, 1997; RYALS *et al.*, 1997; KINKEMA *et al.*, 2000). Bei Isolierungsversuchen von Protein-Interaktionspartnern (MOU *et al.*, 2003) konnte gezeigt werden, dass NPR1 in der Zelle oligomerisiert und in Abhängigkeit von Salizylsäure (SA) während der SAR in reduzierter Form als Monomer im Zellkern akkumuliert (KINKEMA *et al.*, 2000; MOU *et al.*, 2003). Diese Akkumulation korreliert mit einer verstärkten Genexpression der PR (PATHOGENESIS-RELATED)-Gene (MOU *et al.*, 2003). *In vivo* vermittelt die monomere reduzierte Form von NPR1, die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2 und TGA3 an den Promotorbereich von *PR1* (PATHOGENIS RELATED1)-Genen (FAN and DONG, 2002; JOHNSON *et al.*, 2003). Eine Protein-Interaktion mit NPR1 konnte für fünf weitere TGA-Transkriptionsfaktoren - TGA1, TGA4, TGA5, TGA6 und TGA7 - *in vitro* nachgewiesen werden (ZHANG *et al.*, 1999; DESPRES *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000; CHERN *et al.*, 2001; FAN and DONG, 2002; DESPRES *et al.*, 2003; UQUILLAS *et al.*, 2004). Die Interaktion wird dabei über den C-Terminus der TGA-Faktoren vermittelt (ZHOU *et al.*, 2000; FAN and DONG, 2002). Allerdings besitzt NPR1 eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen TGA-Faktoren. So interagiert NPR1 mit abnehmender Affinität an die TGA-Faktoren TGA3, TGA2, TGA5, TGA6 und TGA7 (DESPRES *et al.*, 2003).

Eine Interaktion mit den TGA-Faktoren TGA1 und TGA4 konnte zunächst nicht festgestellt werden. Erst durch Veränderung des Redox-Zustandes konnte die Affinität von TGA1 und TGA4 gegenüber NPR1 erhöht werden (DESPRES *et al.*, 2003). In oxidiertem Form verhindern intramolekulare Disulfidbrücken eine mögliche Interaktion mit NPR1 (MOU *et al.*, 2003). Durch den SAR-vermittelten Anstieg an SA kommt es durch Reduktion der Cysteinreste (Cys-260 und Cys-266) zur Reduktion der Disulfidbrücken, so dass eine Interaktion mit dem NPR1-Protein stattfinden kann (DESPRES *et al.*,

2003). Jedoch scheinen die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA1 und TGA4, im Gegensatz zu den Faktoren TGA2, TGA5 und TGA6, keine entscheidende Rolle bei der SAR zu spielen (KESARWANI *et al.*, 2007). So ist die *Arabidopsis thaliana tga2tga5tga6*-Mutante, wie die *npr1*-Mutante, besonders anfällig gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (CAO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigt die TGA-Dreifach-Mutante keine SA-abhängige Expression von *PR1* und ist in der Ausbildung der SAR blockiert (CAO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2003). Somit stellen sowohl NPR1 als auch die TGA-Faktoren TGA2, TGA5 und TGA6 positive Regulatoren der PR-Genexpression dar (ZHANG *et al.*, 2003).

Arabidopsis thaliana npr1-Mutanten, in denen zusätzlich das Gen *SNI1* (SUPPRESSOR OF NPR1-1, INDUCIBLE 1) nicht funktionsfähig ist, verhalten sich wie *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Li *et al.*, 1999). *SNI1* ist ein Repressor der PR-Gene und fungiert somit als negativer Regulator der SAR (Li *et al.*, 1999). Li *et al.*, (1999) postulieren, dass das durch SA aktivierte NPR1-Protein die Wirkung des putativen Repressors *SNI1* aufhebt und ein zweiter von NPR1 unabhängiger Aktivierungsschritt die TGA-vermittelte Genexpression der PR-Gene reguliert (Li *et al.*, 1999). In neueren Untersuchungen konnte überdies nachgewiesen werden, dass der TGA-Transkriptionsfaktor TGA2 selbst einen Repressor für die PR-Genexpression darstellt (KESARWANI *et al.*, 2007). Der TGA-Transkriptionsfaktor TGA2 scheint daher sowohl ein positives als auch negatives Element in der SA-vermittelten PR-Genexpression darzustellen (KESARWANI *et al.*, 2007). Möglicherweise hat die Interaktion von NPR1 und TGA2 eine Rekrutierung des TGA-Transkriptionsfaktors in den Promotorkontext der PR-Gene zur Folge. Nach Induktion von Salizylsäure werden die Repressorproteine TGA2 und *SNI1* über einen noch unbekannten Mechanismus abgebaut. Parallel dazu wird die Bindung von TGA1, TGA2, TGA3, TGA5 und TGA6 an den *PR1*-Promotorbereich über NPR1 vermittelt (JOHNSON *et al.*, 2003; KESARWANI *et al.*, 2007). Ein weiterer positiver Regulator ist aber auch hier nötig, um den Effekt der putativen Repressorproteine überwinden zu können.

I.6 Zielsetzung

In unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass in Folge von Pathogeninfektion nicht nur die Konzentration der Jasmonate JA und OPDA, sondern auch die Konzentration der Cyclopentenon-Phytoprostane PPA₁ und PPB₁ ansteigen. So konnte ein deutlicher Anstieg der Phytoprostane PPA₁ und PPB₁ nach Verwundung mit dem Pathogen *Botrytis cinerea* gezeigt werden (THOMA *et al.*, 2003). Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass PPB₁ neben Genen, die an der Biosynthese des Sekundärmetaboliten Camalexin beteiligt sind, Detoxifizierungs- und Stressgene induziert (LOEFFLER *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weiterführende Versuche zur biologischen Aktivität durchgeführt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Jasmonaten könnten Phytoprostane ein den Jasmonaten entsprechendes Aktivitätsspektrum

besitzen. Besonders auffällig sind die strukturellen Parallelen von OPDA und PPA₁. Daher sollten insbesondere dieses Phytoprostan bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht werden.

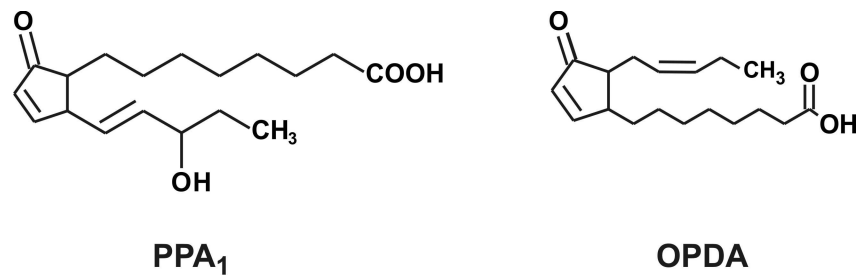


Abbildung I.8 Strukturformeln von Phytoprostan A₁ (PPA₁) und 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA)

Zur systematischen Analyse des Phytoprostans PPA₁ sollte eine Transkriptomanalyse in einer mixotrophen Zellkultur von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt werden, daran anschließend der Vergleich des PPA₁-vermittelten Genexpressionsprofils mit dem Expressionsprofil weiterer oxygenierter Fettsäurederivate erfolgen. Ferner sollte die durchgeführte Genexpressionsanalyse dazu dienen, mit Hilfe bioinformatischer Methoden mögliche Signaltransduktionsfaktoren, die an der Vermittlung der Reaktion auf Phytoprostane beteiligt sind, zu identifizieren.

Die Signalwirkung der Phytoprostane beschränkt sich nicht auf die Induktion von Abwehr- und Stress-relevanten Genen. Tatsächlich ist eine Vielzahl physiologischer Prozesse, darunter Zellteilung und Wurzelwachstum, von den Phytoprostanen abhängig. Hieraus resultiert die Notwendigkeit, Phytoprostananalysen nicht nur auf Genexpression zu beschränken, sondern die biologische Aktivität der Phytoprostane auch in physiologischen Experimenten zu untersuchen.

Während für die JA in der Literatur beschrieben ist, dass sie in nachgeschalteten enzymatischen Reaktionen selbst als Substrat dienen kann, sind für Phytoprostane keine Metabolisierungsreaktionen bekannt. So sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Phytoprostane metabolisiert werden können.

II. Material und Methoden

II.1 Chemikalien, Enzyme

Die handelsüblichen Chemikalien wurden in der entsprechenden Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen).

II.1.1 Spezielle Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37%)	AppliChem (Darmstadt)
Agarose LOW EEQ	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt)
Bacto-Agar	AppliChem (Darmstadt)
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	AppliChem (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau R250	AppliChem (Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt)
Gamborg B5-Vitamine	Duchefa (Haarlem, NL)
Glycerin 98%, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	AppliChem (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Merk (Darmstadt)
Murashige & Skoog (MS) Salze (Art. Nr.:MO254)	Duchefa (Haarlem, NL)
myo-Inositol	AppliChem (Darmstadt)
PMSF	AppliChem (Darmstadt)
Rubidiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosyl	AppliChem (Darmstadt)
SDS	AppliChem (Darmstadt)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
QIAzol	Qiagen (Hilden)

II.1.2 Antibiotika

Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt)
Rifampycin	AppliChem (Darmstadt)
Tetracyclin	AppliChem (Darmstadt)

II.1.3 Enzyme und Puffer

DNase I Amplification Grade	Invitrogen (Karlsruhe)
Klenow-Fragment	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
LR-Clonase	Invitrogen (Karlsruhe)
M-MLV Reverse-Transcriptase	Promega (Mannheim)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
SYBR Green Mix	Thermo (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

II.1.4 Proteinmarker

Pre-stained Proteinmarker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
---------------------------	------------------------------

II.1.5 Säulenmaterial für die Proteinreinigung

Protino Ni-TED	Macherey-Nagel (Düren)
----------------	------------------------

II.1.6 Andere Reagenzien, Materialien und Kits

[alpha- ³² P] dATP	Hartmann Analytik (Braunschweig)
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo (Karlsruhe)
DecaLabel™ DNA Labelling Kit	Fermentas (St. Leon-Roth)
Desoxynucleotide	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
DNA-Leiter 1kb	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
FUJI-Medical X-Ray Film	Fuji (Japan)
Microcon	Millipore (Bedford, USA)
NucleoSpin® Extract II	Machery-Nagel (Düren)
NuPAGE-Gel 12.5%	Invitrogen (Karlsruhe)
Nylonmembran	Roche Diagnostics (Mannheim)

Percoll	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
pGEM®-T-easy Vektor	Promega (Mannheim)
PVDF-Membran	GE-Healthcare (München)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIALyse Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

II.1.7 Laborgeräte

Agarose-Gel Dokumentation	Intas (Göttingen)
Chemilumineszenzkamera/ VisiLuxx Imager	Visitron Systems (Puchheim)
Eppendorf Kühlzentrifugen 5417R und 5804	Eppendorf (Hamburg)
Hybridisierungssofen HL-2000HybriLinker	Peqlab (Erlangen)
Klimaschrank	Percival (USA)
NuPAGE	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR Express	Therma Hybaid (Ulm)
Realplex	Eppendorf (Hamburg)
Roche Light Cycler	Roche Diagnostics (Mannheim)
Schüttler	GFL (Burgwedel)
Schwingmühle MM201	Retsch (Haan)
SDS-Minigel-Apparaturen	Peqlab (Erlangen)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Western Blot Apparatur	Peqlab (Erlangen)

II.2 Nährmedien

II.2.1 Bakterienmedien

<u>KB-Medium (Kings-Brown-Medium) :</u>	40 g/l Proteose Peptone 3
	20 g/l Glycerin
	10 ml/l MgSO ₄ (10%, [m/v])
	10 ml/l K ₂ HPO ₄ (10%, [m/v])
	für Festmedium: 15 g/l Agar-Agar

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) :

- 10 g/l Bacto-Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl
- pH 7.0
- für Festmedium: 15 g/l Agar-Agar

TB-Medium (Terrific-Broth-Medium) :

- 10 g/l Bacto-Trypton
- 20 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl
- pH 7.0

II.2.2 Pflanzenmedien

MS-Medium (Murashike-Skoog-Medium) :

- 4.8 g/l MS-Salze (inkl. MES)
- 30 g/l Saccharose
- 0.1 g/l myo-Inositol
- 1 ml/l B5-Vitamine
- pH 5.7 \pm 0.3

Gamborg B5 Medium :

- 4.8 g/l Gamborg B5 Medium
- 20 g/l Saccharose
- 0.1 g/l myo-Inositol
- pH 5.7 \pm 0.3

II.2.3 Antibiotika

Antibiotika-Stocklösungen:

Endkonzentrationen

Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Timentin	160 mg/ml	160 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	30 mg/ml	30 µg/ml
Hygromycin	30 mg/ml	30 µg/ml

Alle Medien wurden 30 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Komponenten, wie die verwendeten Antibiotika, wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

II.2.4 Pufferlösungen

Die jeweiligen Pufferlösungen wurden in der Regel in zehnfacher Konzentration (10x) angesetzt und autoklaviert (30 min 121°C, 2 bar) oder sterilfiltriert. Die jeweiligen pH-Werte wurden entweder mit HCl oder NaOH eingestellt.

Tabelle II.1: Puffer-Zusammensetzung

Puffer	Bestandteile (1x)	pH
FA	20 mM MOPS	7.0
	5 mM Natriumacetat	
	1 mM EDTA	
	1 M NaOH	
NaPi	1 M Na ₂ HPO ₄	7.5
	1 M NaH ₂ PO ₄	
PBS	23 mM NaH ₂ PO ₄	7.4
	17 mM NaH ₂ PO ₄	
	100 mM NaCl	
SSC	150 mM NaCl	7.0
	15 mM Natriumcitrat	
TAE	40 mM Tris-Acetate	
	1 mM EDTA	
TE	10 mM Tris-HCl	7.4
	1 mM EDTA	
TfB1	100 mM Rubidiumchlorid	5.8
	50 mM Manganchlorid	
	30 mM Kaliumacetat	
	10 mM Calciumchlorid	
	15 % (v/v) Glycerin	
TfB2	10 mM MOPS	6.8
	10 mM Rubidiumchlorid	
	75 mM Calciumchlorid	
	15 % (v/v) Glycerol	

II.3 Versuche mit Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen

Versuche mit pflanzlichem Material wurden entweder in 24-Loch Multischalen (Nunc, Wiesbaden) oder in Erlenmeyerkolben durchgeführt. Alle Experimente erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die auf ihre biologische Aktivität zu testenden Substanzen wurden als methanolische Lösung zugesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Endkonzentration an Methanol 2% (v/v) nicht überstieg, um toxische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

II.3.1 Pflanzenmaterial

Für alle durchgeführten Experimente wurden *Arabidopsis thaliana* Samen verwendet. Die Pflanzenanzucht erfolgte bei 22°C Tages- und 16°C Nacht-Temperatur in Klimaschränken der Firma Percival. Die Beleuchtungszeit betrug neun Stunden. Zur Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen wurden diese für zwei Minuten mit 700 µl Ethanol (70%) inkubiert. Nach Entfernung des Alkohols wurden die Samen für zehn Minuten in einer 1.5%igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung, die mit 0.1% Tween 20 versetzt war, inkubiert. Um restliches Natriumhypochlorit zu entfernen, wurden die Samen viermal mit sterilem Wasser (700µl) gewaschen und im Anschluss auf MS-Agarplatten bzw. in MS-Flüssigmedium bei 22°C kultiviert.

II.3.2 *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur

Die Anzucht der mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen, die uns vom Laboratoire de Cytologie Expérimental et Morphogenèse Végétale der Universität Marie Curie, Paris zur Verfügung gestellt wurde erfolgte in Gamborg B5-Medium mit einem Zuckeranteil von zwei Prozent (siehe Material und Methoden II.2.2). Die Kultivierung der Zellsuspensionskulturen erfolgte bei 26°C im Dauerlicht auf Rotationsschüttlern bei 100 rpm. Erhaltungskulturen wurden nach sieben Tagen in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 15 ml frischem Medium und 50 ml Inokulum überimpft. Die Behandlung erfolgte mit drei Tage alten Zellkulturen. Dabei wurden 10 ml der Zellkultur einen Tag vor der Behandlung in einen 50 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Testsubstanzen (PPA₁, PPB₁, dPPJ₁, OPDA und JA) in einer Endkonzentration von 75 µM. Parallel wurden als Kontrollansatz 10 ml Zellkultur mit einer Methanol-Endkonzentration von 1 Prozent (v/v) behandelt. Zur Gewinnung von RNA, wurden die Pflanzenzellen mittels Zentrifugation (4000 rpm, 20 Minuten bei 4°C) vom Medium abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellkultur-Pflanzenmaterial bei -80 °C aufbewahrt.

II.3.3 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Um in Experimenten den Einfluss der Oxylipine PPA₁, OPDA und JA in zehn Tage alten Pflanzen zu testen, wurden die jeweiligen *Arabidopsis thaliana* Samen sterilisiert (siehe Material und Methoden II.3.1) und in einer 24-Loch Multiwellschale in 1 ml MS-Medium (siehe Material und Methoden II.2.2) kultiviert. Die Pflanzenanzucht erfolgte, wie unter den in II.3.1 beschriebenen Bedingungen, auf einem Schüttler (200 rpm) über einen Zeitraum von zehn Tagen. Nach sieben Tagen wurde das MS-Medium gegen frisches MS-Medium ausgetauscht. Am zehnten Tag wurden die Pflanzen durch Zugabe der jeweiligen Testsubstanz (75 µM) in das MS-Medium behandelt. Parallel dazu wurden die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit 0.5% (v/v) Methanol behandelt. Zur Gewinnung der RNA wurden die Pflanzen zunächst vorsichtig mit Zellstoff abgetupft und anschließend sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pflanzenmaterial bei -80°C aufbewahrt.

II.3.4. Assay zur Untersuchung des Wurzelwachstums

In Wurzelwachstumsversuchen wurde der Einfluss der Oxylipine PPA₁, OPDA und JA auf die Keimungsfähigkeit bzw. das Wurzelwachstum untersucht. *Arabidopsis thaliana* Samen der entsprechenden Mutanten und Wildtyp-Pflanzen wurden sterilisiert (siehe Material und Methoden II.3.1) und auf MS-Agarplatten (12 cm x 12 cm) ausgebracht. Die zu untersuchenden Substanzen wurde in einer Konzentration von 25 µM dem autoklavierten, abgekühlten MS-Medium (15 ml) zugesetzt. Parallel dazu wurde in einem Kontrollansatz der durch Methanol vermittelte (2% [v/v]) Hemmeffekt untersucht. Die Platten wurden unter den in II.3.1 beschriebenen Bedingungen in vertikaler Ausrichtung über einen Zeitraum von acht Tagen kultiviert. Der durch die jeweiligen Oxylipine vermittelte Hemmeffekt wurde durch Vermessung der Wurzellänge dokumentiert.

II.4 Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)

E.coli TOP10 wurde für die Klonierungsarbeiten verwendet. Die Kultivierung erfolgte wahlweise in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 37°C und 250 rpm oder auf LB-Festmedium (siehe Material und Methoden II.2.1) bei 37°C im Wärmeschränk.

Echerichia coli BL21 DE3 (Novagen, USA)

E.coli BL21 DE3 wurde für die Herstellung des rekombinaten GST6his Proteins verwendet. Die Kultivierung erfolgte in TB-Flüssigmedium (siehe Material und Methoden II.2.1) über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 28°C und 250 rpm.

Escherichia coli M15 (Invitrogen, Karlsruhe)

E.coli M15 Bakterien wurde für die Herstellung der rekombinaten OPR1his und OPR3his Proteine verwendet. Die Kultivierung erfolgte in TB-Flüssigmedium (siehe Material und Methoden II.2.1) bei 28°C und 250 rpm über Nacht.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

Der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) wurde zur Infiltration von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Anhand dieser Pathogen Behandlung sollten Aussagen über das Vorkommen verschiedener Fettsäuren und ihrer möglichen Glutathion-Addukte getroffen werden. Die Kultivierung erfolgte in KB-Flüssigmedium (siehe Material und Methoden II.2.1) bei 28°C und 250 rpm. Der verwendete Stamm wurde uns von Brian Staskawicz (Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

II.5 Plasmide

pGEM-T-easy (Promega, Mannheim)

Dieser linearisierter Klonierungsvektor wurde zur Subklonierung von PCR-Produkten verwendet. Er hat eine Größe von 3015 bp auf und trägt an den 3'-Enden jeweils einen Thymidin-Überhang. Diese sind mit den von der *Taq*-Polymerase erzeugten Adenin-Überhängen kompatibel.

pPSI

Für die Studie zur Lokalisation von GST6 wurde der Vektor pPSI (12554 bp), ein Abkömmling des Vektors pGPTV-Kan, modifiziert (BECKER *et al.*, 1992). Dieser Vektor wurde um den kodierenden Bereich von GST6 (653 bp) und EGFP (5371 bp) erweitert.

pEGFP (Clontech, USA)

Für die Untersuchung der Lokalisation von GST6 wurde der Vektor pEGFP (4151 bp) zur Amplifikation des kodierenden Bereiches der GFP-Variante eGFP verwendet. Dieser 744 bp große Bereich wurde zunächst mittels PCR amplifiziert und zur Sequenzüberprüfung in den Vektor pGEM-T-easy subkloniert. Anschließend wurde mittels Restriktionsverdau der Sequenzbereich in den pPSI-Vektor ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde pPSI-EGFP (13261 bp) benannt.

pET28 (Clontech, USA)

Dieser Expressionsvektor diente zur Herstellung des heterolog exprimierten Proteins GST6his. Der 5371 bp große Vektor enthält den T5-Promotor eine lac-Operatorsequenz und eine synthetische ribosomale Bindestelle, die auf eine hohe Expressionsrate in *E.coli* optimiert ist.

II.6 Molekularbiologische Methoden

II.6.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR-Methode angewendet (MULLIS and FALOONA, 1987). Als Matrize (Template) wurden je nach Aufgabenstellung sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Durch die Verwendung entsprechender Primer war es möglich spezifische Restriktionsschnittstellen an die entstehenden PCR-Produkte anzufügen. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurden sowohl *Taq*-(*Thermus aquaticus*) als auch *Pfu*-DNA-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) verwendet. Letztere verfügt gegenüber der *Taq*-Polymerase über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zur Korrektur falsch eingebauter Nukleotide.

Ansatz mit *Taq*-Polymerase (V=20µl)

Template	10-100 ng
Taq-Buffer	1 x
MgCl ₂	1.5 mM
d`NTP`s	0.2 mM
Primer 1	0.15 pmol
Primer 2	0.15 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Ansatz mit *Pfu*-Polymerase (V=50µl)

Template	10-100 ng
Taq-Buffer	1 x
MgCl ₂	1.5 mM
d`NTP`s	0.2 mM
Primer 1	0.15 pmol
Primer 2	0.15 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 50µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	5 min	94°	
<hr/>			
Denaturierung	45 s	94°C	
Annealing	45 s	50-60°C	35 Zyklen
Polymerisation	45 s	72°C	
<hr/>			
Finale Polymerisation	10 min	72°C	

Tabelle II.2: Primer zur Herstellung von PCR-Fragmenten zur Klonierung

Größe (bp)	Primerkombination 5'→3'
<i>GST6</i> At2g47730 (449 bp)	AGTCAAGAGCCATCACACAGTACC CTACTGCTTCTGGAGGTCAATAACC
<i>CYP81D11</i> At2g28740 (498 bp)	TATGAGCCGTCGGATCTACATC ATGTCAACAAAGACAATAATGGA
<i>PDR12</i> At1g15520 (302 bp)	GTTTCTTGAGTTTCCAGAGGAGTTTC CCAAGCGAGTAATAGTATGAGAAGAAAC
<i>UGT73B2</i> (At4g34135) (542 bp)	CCGGAAGCTTCTAACCCTGC AAGACTTGTGTTCCACGGCAC
<i>GSTU19</i> At1g78380 (371 bp)	ACTAGGACAAGCCATTAAATCCAG GACATTGCGTTGATTGGATTCTAC
<i>GSTU24</i> At1g17170 (341 bp)	GTGAATGTTACGGCGAGAAGG TACTCCAACCCAAGTTTCTTCCTAC
<i>HSP17.6</i> At2g29500 (439 bp)	CCAGAGATCTGAATAGACTTAACATCAG TCTTCAACAACAACAGACGAAGC
<i>HSP70</i> At3g12580 (464 bp)	CGTGTAGAGTATTATGCCCAGTCG CGATCAAGGACGAGAAGATCG
<i>MRP1</i> At1g30400 (368 bp)	CGGAGAATCTTCTTCTTTCAAATGGA AGAGATGTCACTTTGGTTTAGAGAGTC

Eli-3-2	GAGGAAGATGGTAATGGGAAGTATG
At4g37990	CTATTCATTTATTGGATTAAGCATACCA
(329 bp)	
AOX3	CAGAGTTTGAACGGTCCAATATG
At1g32350	ATGAACATAACCCAATCTGAAGATC
(498 bp)	
OPR1/2	ATGGAGCTAATGGCTATCT
At1g76680	GGTAATCGGTGTAACCGAC
(549 bp)	
ToIB	TCACGAGCAACCTGATCG
At4g01870	GTGGTAGCCGAGGAACTC
(613 bp)	

Tabelle II.3: Primer zur Herstellung eines PCR-Fragmentes zur Klonierung eines Expressionsvektors

Größe (bp)	Primerkombination 5'→3'	Schnittstellen
GST6	CATCCCATGGCCAGTATCAAGGT	<i>NcoI</i>
At2g47730	AAC <u>TCGAG</u> CTGCTTCTGCTTCTGGAGGTCAATAACC	<i>XhoI</i>
(653 bp)		

Tabelle II.4: Primer zur Herstellung eines PCR-Fragmentes zur GATEWAY-Klonierung

Größe (bp)	Primerkombination 5'→3'	Schnittstellen
OPR1	CTTTTTGGATCCAATTCTCTGAGATTTCTG	<i>BamHI</i>
At1g76680	CCATCTCGAGTTCTTTTGTAATAAACTGTTG	<i>XhoI</i>
(2092 bp)		
OPR3	CAATCCGGATCCCTTACAACATCATGCTTACC	<i>BamHI</i>
At2g06050	GTCATCTCGAGGTCTCCGCCGATCTG	<i>XhoI</i>
(2311 bp)		

II.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurden 0.7-1.5%ige ([w/v] in TAE-Puffer) Gele verwendet. Diese Gele wurden mit je 0.2 µg/µl Ethidiumbromid versetzt, um nach Abschluss der Elektrophorese die DNA-Banden unter UV-Licht (364 nm) zu lokalisieren. Zur Erhöhung der Dichte der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffer (0.25% Bromphenolblau; 0.25% Xylencyanol; 30% Glycerin) versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TAE-Puffer (4 mM Tris-Base; 0.1% (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA), in dem das mit DNA Proben beladene Gel bei einer Spannung von 80-120 V für etwa 1-1.5 Stunden belassen wurden. Anschließend konnte die Auftrennung unter UV-Licht dokumentiert werden.

II.6.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem Nucleo Spin Extract II (Macherey und Nagel, Düren) entsprechend der Anleitung des Herstellers aus der Gelmatrix isoliert.

II.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet, welche die freien 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent verbindet. Dabei können sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpft werden.

Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA:	0.2 µg
T4 DNA-Ligase	1 U/µg DNA
10x Ligase-Puffer	2 µl
steriles H ₂ O	ad 10 µl

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation wurde entweder für 2 Stunden bei RT oder für 12 Stunden bei 16°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter *E.coli*-TOP10 (siehe unter II.4) Zellen verwendet.

II.6.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Durch diese Methode sollte die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aufzunehmen, erhöht werden. Dies wird durch die Modifikation der Zellwand durch CaCl_2 und RbCl erreicht. Es wurden 3 ml LB-Medium (siehe Material und Methoden, II.2.1) mit einer *E.coli*-Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{600} von 0.6 bei 37°C inkubiert. Die Bakterien, die sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden zunächst für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation bei 3000x g für 10 min bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 15 ml eiskaltem Tfb1-Puffer (100 mM RbCl ; 50mM MnCl_2 ; 30mM KOAc ; 10mM CaCl_2 ; 1-5% Glycerin; pH 5.8) resuspendiert, für weitere 90 min auf Eis inkubiert und dann bei 3000x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml kaltem Tfb2-Puffer (10 mM MOPS; 10 mM RbCl ; 75 mM CaCl_2 ; 15% Glycerin; pH 6.8 einzustellen mit KOH) aufgenommen. 50 μl -Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

II.6.6 Transformation von Bakterien

Zur Transformation kompetenter Bakterien wurde ein 50 μl -Aliquot auf Eis aufgetaut mit dem Liagtionsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 500 μl LB-Medium (siehe Material und Methoden II.2.1) versetzt. Zur Regeneration der Zellen folgte eine Inkubation für 45 min bei 37°C auf einem Schüttler bei 500 rpm. Die Zellsuspension konnte im Anschluss daran auf Selektionsplatten ausgebracht werden. Die Kultivierung transformierter Bakterien erfolgte für 12-16 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank.

II.6.7 Identifizierung transformierter Bakterien-Kolonien „Colony Screen“

Zur Identifizierung transformierter Bakterien wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien, die auf den Selektionsplatten über Nacht gewachsen waren, in je 25 μl sterilem Wasser aufgenommen, wovon 10 μl als Matritze für die folgende PCR dienten. Die verwendeten Primerpaare waren in Abhängigkeit des zu untersuchenden Konstruktes zu wählen. Die restlichen 15 μl der Bakteriensuspension konnten nach der Identifizierung eines positiven Klons direkt zum Animpfen auf Selektionsmedium verwendet werden.

Reaktionsansatz:

Template	10 µl Bakteriensuspension
Taq-Puffer	1x
MgCl ₂	1.5 mM
Primer 1	0.15 pmol
Primer 2	0.15 pmol
Taq-Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	5 min	95°	
<hr/>			
Denaturierung	1 min	94°C	
Annealing	45 s	50-60°C	35 Zyklen
Polymerisation	45 s- 2 min	72°C	
<hr/>			
Finale Polymerisation	10 min	72°C	

II.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA (>20 µg) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet. Diese basiert auf dem Prinzip, dass chromosomale DNA in basischem Milieu denaturiert und durch anschließende pH Absenkung ausfällt, während „supercoiled“ vorliegende Plasmid-DNA stabil bleibt, oder sich wieder renaturieren kann. Dafür wurden 2 ml einer 3 ml Übernachtskultur bei 20000x g pelletiert, der Überstand sorgfältig entnommen und der Rückstand in 250 µl Lösung I (50 mM Glucose; 25 mM Tris, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung II (20 mM NaOH; 1% SDS) wurde das Reaktionsgefäß 4-5-mal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die chromosomale DNA sowie Zellfragmente mit 250 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat) für 10 min auf Eis ausgefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 20000x g wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und daraus die Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol präzipitiert. Um restliche Salze zu entfernen, wurde das Pellet anschließend mit 1 ml 75%igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und dann in 25 µl H₂O aufgenommen.

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (> 20 µg) wurde der *Plasmid Midi Kit* (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

II.6.9 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 400 µl einer frischen Bakterienkultur mit 300 µl einer 50%igen sterilen Glycerinlösung versetzt, gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

II.6.10 Quantifizierung von DNA bzw. RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Gesamt-RNA wurde in einer 1:100 Verdünnung an einem entsprechenden Spektralphotometer durchgeführt.

II.6.11 Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977) am Lehrstuhl für Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut (Würzburg) mit einem Li-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

Tabelle II.5: Primer zur Sequenzierung von DNA-Sequenzen innerhalb von Klonierungsvektoren:

Primernamen	Primersequenz (5'→3')
T7 hat	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6ht	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC
M13 for	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 rev	AAC AGC TAT GAC CAT G

II.6.12 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Bakterielle Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifisch, meist palindromische DNA-Sequenzmotive von 4 bis 10 bp und können diese innerhalb des Erkennungsmotivs oder in einem Abstand von einigen Basenpaaren hydrolisieren. Die dabei entstehenden Schnittstellen können nach Spezifität der Endonukleasen glatte oder überhängende Enden aufweisen.

Reaktionsansatz:

DNA	0.5-10 µg
Restriktionsenzym	1-2 U/µg
10 x Reaktionspuffer	2-3 µl
steriles H ₂ O	ad 10-20 µl

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde für ein bis drei Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle des Restriktionverdaus wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Material und Methoden II.6.2).

II.6.13 Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte sowohl mit dem TRIzol-Reagenz, als auch dem *RNeasy-Plant Mini Kit* (Qiagen)

II.6.13.1 RNA-Präparation mit der TRIzol-Methode

Zur Präparation der Gesamt-RNA wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt. Nach Zugabe einer Keramikugel wurden die Proben in einer Schwingmühle für 2 min bei 24 Hz homogenisiert. Anschließend folgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 5 min. Im folgenden wurde die Suspension mit 200 µl Chloroform versetzt und für 15 s ausgeschüttelt. Nach einem weiteren fünf-minütigem Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 4°C für 15 min bei 12000x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit Chloroform (500 µl) extrahiert und zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die RNA aus der oberen Phase mit 700 µl Isopropanol bei 4°C für 10 min bei 12000x g gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem EtOH gewaschen, getrocknet, in 20 µl H₂O aufgenommen und für 10 min bei 60°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

II.6.13.2 RNA-Präparation mit dem *RNeasy-Plant Mini Kit*

Bei der Verwendung des *RNeasy-Plant Mini Kit* wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

II.6.14 Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende 1%ige (w/v in 1x FA-Puffer, 2% Formaldehyd) Agarosegele verwendet. Alle Geräte, die mit den RNA-Proben in Berührung kamen, mussten vor Gebrauch von RNase-Kontaminationen befreit werden. Dies erfolgte durch ein mehrstündiges Einlegen der Geräte in eine 3%ige H₂O₂-Lösung. Jeweils 8 µg Gesamt-RNA wurden mit ¼ Volumen 5x RNA-Probenpuffer (40% (v/v) 10x FA-Puffer; 30.8% (v/v) Formamid; 20% (v/v) Glycerin; 7.2% (v/v) Formaldehyd; 0.8% (v/v) EDTA; 0.16% (v/v) Bromphenolblau-Lösung) versetzt, für 5 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für ca. 1-1.5 Stunden in 1x FA-Laufpuffer (20 mM MOPS; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA).

II.6.15 RNA-Transfer (Northern-Blot)

Die "Northern-Blot-Analyse" diente dem Nachweis spezifischer mRNA. Damit kann die Expression bestimmter Gene auf der Ebene der Transkription semiquantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Der Transfer von RNA auf Nylonmembranen erfolgte aus denaturierenden Agarosegelen, als Transferpuffer diente 10x SSC. Der Aufbau des RNA-Kapillarblots war identisch mit dem des DNA-Blots. Die Transferzeit betrug auch hier 20 Stunden. Nach einer anschließenden Fixierung der RNA auf die Nylonmembran konnte die RNA durch Methylenblau gefärbt und dokumentiert werden.

II.6.16 Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten

Um radioaktive DNA-Sonden herzustellen, wurden 100-200 ng gereinigtes DNA-Fragment mit 50 µCi [alpha-³²P]-dATP (Hartmann Analytik) durch den „DecaLabel™ DNA Labelling Kit“ (Fermentas) nach Herstellerangaben markiert. Die Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide erfolgte unter Verwendung von „Sephadex G50-Columns“ (GE-Healthcare) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde das radioaktiv markierte DNA-Fragment für 10 min bei 95°C denaturiert und sofort verwendet.

II.6.17 Radioaktive Hybridisierung

Alle Schritte der Hybridisierung erfolgten unter ständiger Rotation in einem Wasserbad. Zu Beginn wurde die Nitrocellulose-Membran in ein Plastikbehältnis transferiert und für mindestens 2 Stunden mit Prähybridisierungspuffer (50% (v/v) Formamide; 5x (v/v) SSC; 0.1% (v/v) SDS; 5x (v/v) Denhardt-Lösung) bei 42°C prähybridisiert. Anschließend wurde das radioaktiv markierte DNA-Fragment zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 42°C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x mit Waschlösung I (2x (v/v) SSC; 0.1% (v/v) SDS) für 15 min bei 42°C gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweiter Waschschriff für 15 min mit Waschlösung II (0.2x (v/v) SSC; 0.1% (v/v) SDS), der so oft wiederholt wurde, bis die detektierte Radioaktivität einen angemessenen Wert erreicht hatte. Der zweite Waschschriff wurde ebenfalls bei einer Temperatur von 42°C durchgeführt. Die Membran wurde anschließend für ein bis zwei Tage auf einen Phosphoscreen (Fuji) aufgelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem Phosphorimager (Fuji BAS2000).

II.6.18 Affymetrix-Microarray

Die für die Transkriptionsanalyse verwendeten Microarrays wurden von der Microarray Facility, Universität Tübingen durchgeführt. Die für die Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA wurde zunächst mit dem „*RNeasy Plant Mini Kit*“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Ein µg der Gesamt RNA wurde mit dem „*One Cycle target-labeling Kit*“ der Firma Affymetrix in cRNA umgeschrieben und dabei indirekt mittels Biotin fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden 0.5 µg der markierten cRNA mit dem *Arabidopsis thaliana* ATH1 Chip (Affymetrix) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der Array gewaschen und mittels „*Fluidics Station 450*“ (Affymetrix) nach den Angaben des Herstellers fixiert. Die Detektion biotinylierter cRNA mit den Zielmolekülen erfolgte nach Herstellerangaben mittels Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin als Primär- und biotyliertem anti-streptavidin IgG als Sekundär-Antikörper (Affymetrix). Dieser wurde wiederum mittels Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin Antikörper visualisiert. Die Hybridisierungssignale wurden mittels dem GCS3000 Gene Chip Scanner (Affymetrix) eingescannt. Die als Rohdaten ausgelesenen Fluoreszenzwerte wurden als .CEL-Files abgespeichert. Zur statistischen Auswertung wurden die Rohdaten der .CEL-Files in Genespring 7.1 (Agilent Technologies) importiert. Während des Imports wurden die Daten über GC-RMA normalisiert (Wu, 2003). Zusätzlich zur GC-RMA Normalisierung wurde eine „Per-Gene“ Normalisierung durchgeführt, das heißt die Signale eines Gens werden durch den Median des entsprechenden Gens über den Array dividiert. Dadurch werden die Expressionsprofile aller Gene um eins zentriert, was zum Beispiel für Korrelations- oder Clusteranalysen wichtig ist. Um differentiell exprimierte Transkripte zu ermitteln wurde eine Analyse durchgeführt, in der die deregulierten Transkripte in einzelnen paarweisen Vergleichen ermittelt wurden. Im ersten Schritt wurden diejenigen Transkripte ausgewählt, deren Expressionsniveau im

Mittel in den behandelten Proben um den Faktor zwei höher oder niedriger war als in den Kontrollen. Um eine Aussage treffen zu können, ob diese Änderung mit einer statistischen Signifikanz auftritt, wurde ein Welch t-Test mit Benjamini-Hochberg Multiple Testing Correction (BENJAMINI, 1995) mit einem p-Value Cutoff von 0.05 durchgeführt. Die Probeset IDs der regulierten Transkripte wurde mit den Annotationen aus NetAFFX verknüpft.

II.6.19 Gateway-Klonierung

Für Gateway®-Klonierungs-Reaktionen (Invitrogen) wurden die gewünschten kodierenden Sequenzen in den Vektor pENTR-MCS (siehe Material und Methoden II.4) so kloniert, dass diese von den beiden Rekombinationsstellen attL1 und attL2 flankiert wurden. Die „LR-Clonase“-Reaktionen um die DNA-Fragmente der „entry“-Klone in den „destination“-Vektor pMDC-LUC (12895 bp) zu übertragen, wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Das Produkt der Rekombination (LR-Reaktion) wurde verwendet um den *E.coli*-Stamm TOP10 mittels Hitzeschock zu transformieren.

II.6.20 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative RT-PCR-Technologie erlaubt sowohl die Detektion, als auch die quantitative Darstellung der Kinetik und des Ergebnisses einer PCR-Reaktion. Zusätzlich können spezifische PCR-Produkte mit Hilfe einer Schmelzpunkt-Analyse von unspezifischen Amplifikaten unterschieden werden. Die Fluoreszenz-Detektion der Amplifikate beruht hierbei auf der selektiven Interkalierung von SYBR Green I in die, bei der PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA, so dass die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA-Konzentration zunimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene mit Hilfe des LightCyclers (Roche) und Realplex (Eppendorf) untersucht. Der Einsatz von cDNA als Matritze ermöglichte es hierbei, durch den Verlauf der PCR-Reaktion, auf die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkriptes in einer zu untersuchenden Gewebeprobe zu schließen. Die RNA von *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial wurde mit dem Plant RNeasy Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Restliche DNA wurde mit „DNase I Amplification Grade“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Synthese der Einzelstrang cDNA wurde unter Verwendung der „M-MLV Reverse-Transcriptase“ (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und 20-fach in Wasser für die RT-PCR verdünnt. Die quantitative PCR wurde mit dem Light Cycler (Roche) bzw. Realplex (Eppendorf) mit dem SYBR Green Mix (Thermo) durchgeführt.

Reaktionsansatz:

Template c`DNA	2 µl (1:20 Verdünnung)
SYBR-Green Mix	10 µl
Primer 1	10 mmol
Primer 2	10 mmol
Light Cycler H ₂ O	ad 20 µl

Amplifizierungsprogramm:

Initiale Denaturierung	15 min	95°	
<hr/>			
Denaturierung	1 sec.	94°C	
Annealing	7 sec	50-60°C	
Polymerisation	19 sec	72°C	45 Zyklen
Finale Polymerisation	5 sec	79°C	
<hr/>			
Denaturierung des Amplifikats	15 min	75-95°C	

Tabelle II.6: Primer zur Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR verwendet

Größe (bp)	Primerkombination 5'→3'
OPR1	GCACCGCTGAATAAGTACG
At1g76680 (256 bp)	GTAAAGTTTATGTTGGTCTC
OPR2	CTCCTATCTCTTGTACGGG
At1g76690 (492 bp)	TGTGAGAACACGCTGCTAT
OPR3	GCAGAGTATTATGCTCAAC
At2g06050 (322 bp)	GAGGTTTCGGGTACTTCAC

<i>TolB</i>	CAACAGACTCTATTTTCATC
At4g01870	CGCTCGCAGATAACCACTC
(282 bp)	
<i>GST25</i>	CTCGGTGGGAAAAGTTTAG
At2g29420	AAACATTAAGTGACAGAAC
(322 bp)	
<i>CYP81D11</i>	ATTGCCGAGGTAGTTGT
At3g28740	TTGCCTTTCGTAATACT
(343 bp)	
<i>GST6</i>	CCCCGTCGATATGAGAG
At2g47730	TTAAAGACACGCTCGAAGGCA
(273 bp)	
<i>VSP1</i>	ACAAAGAGGCATATTTTAC
At5g24780	GGTTCAATCCCGAGTTCCAA
(241 bp)	
<i>GST6-Short</i>	CCCCGTCGATATGAGAGCCG
At2g47730	TCAGTACCCAACAAGTAATG
(430 bp)	
<i>GST6-Long</i>	TCCCCCTTCTATAAAACACC
At2g47730	GCACCGGCTCTCATATCGAC
(205 bp)	
<i>Actin2/8</i>	GGTGATGGTGTGTCT
	ACTGAGCACAATGTTAC

Da die absolute Molekülanzahl an eingesetzter cDNA nicht genau bestimmt werden konnte, diente ein Abgleich mit der vorhandenen cDNA-Anzahl eines Gens, dass als konstitutiv exprimiert angesehen wird (Actin 2/8) für die relative Quantifizierung. Alle Quantifizierungen wurden auf 10000 Actin cDNA Moleküle normalisiert, welche mit den hierin beschriebenen Actin2/8 Primern amplifiziert wurden (SZYROKI *et al.*, 2001). Jedes Transkript wurde durch individuelle Standards quantifiziert. Eine Eichgerade für alle zu untersuchenden cDNAs wurde mit Hilfe von Standards (10, 1, 0.1 und 0.01 fg Amplifikat/ μ l), die als Proben eingesetzt wurden, erzeugt. Die individuellen Standards wurden vor Verwendung in den Klonierungsvektor pGEM®-Teasy (siehe Material und Methoden II.5)

subkloniert und in *E.coli* TOP10 transformiert (siehe Material und Methoden II.4). Das erhaltene Plasmid konnte abschließend durch Sequenzierung (siehe Material und Methoden II.6.11) überprüft werden.

II.7 Proteinbiochemische Methoden

II.7.1 Proteingehaltsbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung mit dem *BCA Protein Assay Reagent Kit* der Firma Thermo wurde entsprechend der Anleitung durchgeführt. Die Proteinextrakte wurden in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:10) getestet. Von jeder Verdünnung wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

II.7.2 SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes, sowie zur Prüfung der Homogenität und Reinheit von Proteinlösungen, diente die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Deren Trennprinzip basiert auf der unterschiedlichen Molekülgröße (SHAPIRO *et al.*, 1967). Dabei wirken die Poren des SDS-Polyacrylamidgels wie ein Molekularsieb. Die Porengröße hängt vom Mischungsverhältnis der beiden monomeren Komponenten (Acrylamid und *N,N*-Methylenbisacrylamid) ab und wird nach der molaren Masse zu trennenden Proteine ausgewählt. In dieser Arbeit wurden 12.5%ige Gele verwendet. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) lagert sich dabei an die Proteine an und hebt Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen auf. Da mit zunehmender Proteingröße mehr SDS angelagert wird, nimmt die Ladung proportional mit der Molekülgröße zu. Gleichzeitig werden reduzierend wirkende Thiolverbindungen zugegeben, die Disulfidbrücken spalten. Da in der Hauptsache Disulfidbrücken die Tertiärstruktur bzw. in Proteinkomplexen, die Quartiärstruktur aufrechterhalten, führt ihre Spaltung zu einem Verlust dieser Struktur. Proteinkomplexe zerfallen dabei in die einzelnen Komponenten. Die Trenngele (3.2 ml Acrylamid-Stammlösung [37.5% (w/v) Acrylamid; 1.0% *N,N*-Methylenbisacrylamid]; 1.9 ml Trenngelpuffer [1.5 M Tris-HCl, pH 8.8]; 75 µl 10% (v/v) SDS; 2.4 ml H₂O; 50 µl 10% APS-Lösung; 50 µl TEMED) wurden ein Tag vor der Verwendung hergestellt und mit Trenngelüberschichtungslösung (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8; 10% (v/v) SDS) bei 4°C gelagert. Dies gewährleistete, die Auspolymerisierung der monomeren Komponenten und somit eine bessere Auftrennung der Proteine. Die Sammelgele (0.88 ml Acrylamid-Stammlösung [37.5% (w/v) Acrylamid; 1.0% *N,N*-Methylenbisacrylamid]; 1.66 ml Sammelgelpuffer [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8]; 66 µl 10% (v/v) SDS; 4.06 ml H₂O; 50 µl 10% APS-Lösung; 50 µl TEMED) wurden etwa eine Stunde vor Gebrauch gegossen. Die Proteinproben wurden vor der Auftragung auf das Gel mit 5x Proteinpuffer (0.12 M Tris-HCl, pH 6.8; 20% (v/v) Glycerin; 4% (v/v) SDS; 0.02% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 10

min bei 95°C erhitzt. Je nach Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurden bis zu 20 µl Proteinlösung in die Probentaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für ca. 1-1.5 Stunden in 1x Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3; 192 mM Glycin; 0.1% (v/v) SDS).

II.7.3 Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Für die Färbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde Coomassie Brilliant Blau G250 verwendet. Der Farbstoff bindet nicht kovalent an die Aminosäurereste der Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei 200-400 ng Protein pro Bande.

Färbelösung: 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250; 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure

II.7.4 Reinigung von rekombinanten GST6his, OPR1his und OPR3his

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine GST6his, OPR1his und OPR3his aus *E.coli* wurde eine Metallaffinitäts-Chromatographie durchgeführt. Dabei komplexierte das mit sechs Histidinresten versehene, rekombinate Protein zunächst mit den Nickelionen des Trägermaterials. Dieser Komplex konnte nach Auswaschen nicht gebundener Proteine durch einen entsprechenden Kompetitor (Imidazol) wieder aufgehoben werden, und das rekombinante Protein wurde eluiert.

Aufreinigung

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde ein Proteinrohextrakt aus 200 ml Bakterienkultur hergestellt. Dafür wurden Bakterien, die einen Expressionsvektor enthielten, in TB-Medium (siehe Material und Methoden II.2.1) mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Material und Methoden II.2.3) bis zur späten log-Phase kultiviert und anschließend bei 4000x g (10 min) zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden mit 3 ml Lysis-Äquilibration- und Waschpuffer (LEW) (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl, pH 8.0 [mit NaOH]) versetzt und mit Hilfe eines Ultraschallstabes unter Eiskühlung für 6x 10 s mit einer Unterbrechung von je 10 s aufgeschlossen (Pulse/s 2; Stufe 3; 50% Duty Cycle). Die Probe wurde ständig im Eisbad gekühlt, da Erwärmung, übermäßiger Lufteintrag oder mechanische Belastung der Probe zum Funktionsverlust des Proteins führen können. Nach Abtrennung von Zellwandfragmenten (Zentrifugation 10000x g, 30 min, 4°C) konnte der Überstand zur affinitätschromatographischen Reinigung in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Das Nickel-TED-Material wurde vor Gebrauch mit LEW-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das Säulenmaterial zum Proteinrohextrakt gegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule dreimal mit je 3 ml LEW-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran wurde das gebundene

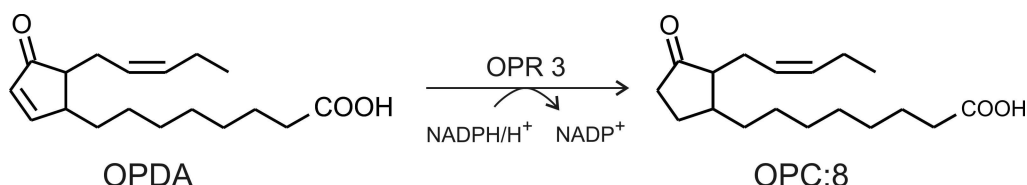


Abbildung II.2. OPDA reagiert in einer durch Oxidoreduktasen (i.e., OPR3) umgesetzten Reaktion spezifisch mit NADPH/H^+ zu OPC:8. Die Produktbildung kann photometrisch bei 420 nm gemessen werden.

Die Abnahme der Extinktion lässt sich graphisch darstellen. Dazu wurden im Standardtest die beiden Cyclopentenone (100 μM) mit den rekombinant aufgereinigten Oxidoreduktasen (10 μg) in einer NADPH-Lösung (120 μM) in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.5) bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Überprüfung der enzymatisch katalysierten Umsetzung wurde in einem parallelen Reaktionsansatz ohne Zugabe der Oxidoreduktasen die Oxidation von NADPH spektralphotometrisch vermessen. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 420 nm über 50 Minuten verfolgt.

II.8 PEG-Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Für die Isolation von stoffwechselaktiven Protoplasten wurden 20-30 mittelgroße, sechs Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Blätter auf der Blattunterseite mit Nassschleifpapier (K240-500) angeraut und in eine mit MCP-Lösung (500 mM Sorbitol; 1mM CaCl_2 ; 10 mM MES; pH 5.6-6.0 [mit KOH]) benetzte Petrischale gegeben. Anschließend wurde die MCP-Lösung vorsichtig abgenommen, und die Blätter in 10 ml Enzymlösung (0.03% (v/v) Pectolyase Y23; 0.75% (v/v) Cellulase YC) bei 26°C inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die Petrischale geschwenkt, wodurch die Blattstruktur zerfiel und die Protoplasten frei wurden. Die Protoplastensuspension wurde auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten gegeben. Dazu wurden 2 ml Percoll, pH 6-Lösung (500 mM Sorbitol; 1mM CaCl_2 ; 20 mM MES) mit der Protoplasten-Lösung unterschichtet und für 8 min bei 300× g in einem Ausschwingrotor mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die intakten Protoplasten sammelten sich oberhalb der Percoll-Lösung und wurden vorsichtig auf einen weiteren Percoll-Gradienten gegeben. Dazu wurden die Protoplasten auf eine 35%ige Percoll, pH 6-Lösung gegeben. Diese Schicht wurde vorsichtig mit 7.5 ml einer 25% igen Percoll, pH 7.2-Lösung (500 mM Sorbitol; 20 mM HEPES) sowie einer 5 ml Sorbitol for Barley-Puffer (400 mM Sorbitol; 30 mM KCl; 20 mM HEPES) überschichtet. Die intakten Protoplasten sammelten sich am Übergang von der 25%igen Percoll-Lösung zu der Sorbitol for Barley-Lösung an. Lysierte Protoplasten reicherten sich hingegen an der Grenze zu der 35%igen Percoll-Lösung an. Nach Zentrifugation (8 min, 200× g) wurden die intakten Protoplasten in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 μl MaMg-Puffer (400 mM Mannitol; 15 mM MgCl_2 ; 5mM MES; pH 5.6 [mit KOH]) versetzt. Für die anschließende Transformation wurde 300 μl Protoplasten-Suspension vorsichtig in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu der Suspension wurde die Plasmid-DNA (50 μg) und 300 μl PEG-MCS-Lösung (400 mM Mannitol; 100 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 40% (v/v) PEG4000;

pH 8.0 [mit KOH]) gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden im Abstand von 5 Minuten unterschiedliche Volumina (600 µl; 1 ml; 2 ml und 4 ml) des W5-Puffers (154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 5 mM Glucose; 1.5 mM MES, pH 6.0) zugegeben. Anschließend wurden die Protoplasten für 5 min bei 60x g sedimentiert und in 2 ml Sorbitol (400 mM) und 500 µl W5-Puffer (400 mM Saccharose; 250 mg/l Xylose; 460 mg/l CaCl₂) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 60x g) wurden die Protoplasten in 3 ml K3-Medium vorsichtig resuspendiert und in einer Petrischale über Nacht bei 22°C inkubiert. Um den Erfolg der PEG-Transformation zu überprüfen wurden am folgenden Tag transformierte *Arabidopsis thaliana* Protoplasten auf einem Objekträger fixiert und die GFP-Fluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 5 Pascal Carl Zeiss Jena, Jena) aufgenommen. Angeregt wurde mit einem Argonlaser (Lasos RMC 7812Z) bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die GFP-Emission wurde zwischen 505 und 530 nm detektiert. Die Bildanalyse erfolgte mit der Zeiss AxioVision Software.

II.9 Testsubstanzen

II.9.1 Oxylipine

II.9.1.1 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA)

12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) wurde *in-vitro* enzymatisch aus α-Linolensäure gewonnen (PARCHMANN *et al.*, 1997). Dabei wurde die ungesättigte Fettsäure in Gegenwart von mit Aceton entfettetem Leinsamenpulver (Leinsamen-Acetonpulver) inkubiert. Das Leinsamenpulver katalysiert dabei die enzymatische Umsetzung zum Allenoxid, welches sich anschließend nicht-enzymatisch zu racemischer OPDA und anderen Nebenprodukten umlagert (BAERTSCHI *et al.*, 1988). Das Produktgemisch konnte mittels präparativer HPLC aufgetrennt werden. Die isolierte OPDA wurde anschließend unter Verwendung eines isopenmarkierten Standards (¹⁸O) quantifiziert.

II.9.1.2 Jasmonsäure (JA)

Die verwendete Testsubstanz wurde als Reinsubstanz von Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen.

II.9.1.3 Phytoprostane

Die Herstellung der Phytoprostane-A₁, -B₁ und -D₁ erfolgte nach den im Lehrstuhl etablierten und beschriebenen Methoden in Anlehnung an (PARCHMANN and MUELLER, 1998) (KRISCHKE *et al.*, 2003) und (THOMA *et al.*, 2003). Zur Gewinnung von PPE₁ bzw. PPD₁ wurde α-Linolensäure in 50%igem MeOH gelöst und bei Raumtemperatur (22°C) unter ständiger Luftzufuhr für 10 Tage gerührt. Anschließend wurde der Autoxidationsansatz bei einem pH-Wert von 3.0 gegen Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in

Chloroform gelöst. Mittels präparativer Säulenchromatographie wurde eine Isomerenmischung von PPE₁ isoliert. PPE₁ wurde anschließend durch säurekatalysierte Dehydratisierung zu PPA₁ bzw. durch basenkatalysierte Dehydratisierung zu PPB₁ umgesetzt. Phytoprostan DeoxyJ₁ wurde ausgehend von PPD₁ durch säurekatalysierte Dehydratisierung hergestellt. Die hergestellten Oxylipine wurden mittels HPLC analysiert und gegen die analogen Prostagladine quantifiziert (THOMA *et al.*, 2003).

II.10 Analytische Methoden

II.10.1 Analytische HPLC-Trennung von Oxylipin-Glutathion Addukten

HPLC-Anlage: 1200 Agilent
Trennsäule: Purospher Star RP 18 endcapped (135 mm x 3 mm, Partikelgröße 5 µm, Merck)
Laufmittel: Acetonitril/Wasser/Essigsäure
Gradient: Acetonitril/Wasser/Essigsäure
0 min: 15:85:0.1 (v/v)
30 min: 45:55:0.1 (v/v)
Flussrate: 0.2 ml/min
Detektion: Micromass Quattro Premier triple-quadrupole Massenspektrometer (Waters)

Die Detektion der Oxylipin-Addukte erfolgte mit einem Waters Micromass Quattro Premier-Massenspektrometer im positiven Elektrospray-Modus (ESI⁺). Die Kapillarspannung betrug 3.0 kV, die Konusspannung 24 V und die Quelltemperatur wurde auf 120°C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 847 l/h mit einer Temperatur von 450°C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 48 l/h verwendet. Detektiert wurden positiv geladene Ionen im Fullscan Modus in einem Masse/Ladungs-Bereich von m/z 100 – 700 bei einer Scan-Rate von 0.5 Scans/sec.

II.10.2 Nachweis der Oxylipin-Glutathion-Addukte aus pflanzlichem Material

II.10.2.1 Anzucht von *Pseudomonas syringae*

Für die Herstellung der zur Infiltration verwendeten Bakterien-Suspension wurden jeweils 50 ml KB-Medium in sterile Erlenmeyerkolben überführt. Das Medium für den avirulenten *Pst*-Stamm wurde mit den jeweiligen Antibiotika versetzt (50 µl Rifampicin, 100 µl Tetracyclin). Es wurden 3 ml KB-Medium mit dem avirulenten *Pst*-Stamm inokuliert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 50 ml KB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ bei 28°C für 2 bis 3 Stunden inkubiert. Die Bakterien, die sie sich nun am Beginn der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden durch Zentrifugation bei 3000x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde 3x mit jeweils 10 ml einer MgCl₂-Lösung (10 mM) gewaschen. Anschließend wurde das

Bakterienpellet in 10 mM MgCl₂ bis zu einer optischen Dichte von 0.2 resuspendiert. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von 10⁸ Kolonien-bildenden Einheiten pro ml Lösung.

II.10.2.2 Infiltration und Ernte des Pflanzenmaterials

Die Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden auf der Blattunterseite durch die Stomata mit einer 1 ml Tuberkulin-Spritze mit den Bakteriensuspensionen infiltriert. Parallel wurden *Arabidopsis* Pflanzen mit einer 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert.

II.10.2.3 Bestimmung der Oxylipin-Glutathion-Addukte

Mit der Entwicklung der HPLC-MS/MS-Methode war es möglich, die Oxylipin Glutathion Addukte in pflanzlichem Material zu bestimmen. Die Isolierung der Fettsäure-Addukte wurde aus Zellgewebe durchgeführt, das unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert wurde. Um eine Autoxidation und damit eine *ex-vivo*-Entstehung von Phytoprostanen aus α -Linolensäure während der Probenaufarbeitung zu verhindern wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zur Extraktion wurden ca. 5 g frisches Pflanzenmaterial mit 2 ml Borsäure/NaOH-Puffer (50 mM, pH 4.0) versetzt. Die Zellen wurden durch eine dreiminütige Dispersion mit einem Ultra-Turrax bei 24000 rpm homogenisiert und zur Trennung der Phasen für 15 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μ l Acetonitril aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde mittels HPLC-MS/MS analysiert (HPLC-MS/MS-Bedingungen siehe II.10.1.1).

II.10.2.4 Herstellung der Referenzsubstanzen von PPA₁- und OPDA-Glutathion-Addukten

Die Glutathion-Addukte von PPA₁ und OPDA wurden nicht-enzymatisch in Anlehnung an die Publikation von (DAVOINE *et al.*, 2005) hergestellt. Dazu wurden in einem Reaktionsansatz (1 ml Endvolumen) PPA₁ bzw. OPDA (jeweils 100 μ M) in Gegenwart einer Glutathion(GSH)-Lösung (1 mM) in 20 mM Borsäure/NaOH-Puffer (pH 10) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Überprüfung der enzymatischen Bildung der Oxylipin-Glutathion Addukte wurden in einem parallelen Reaktionsansatz jeweils die beiden Cyclopentenone (100 μ M) mit dem rekombinat aufgereinigtem GST6-Protein (200 μ g) in einer GSH-Lösung (1 mM) in 20 mM Borsäure/NaOH-Puffer (pH 7.5) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde von den jeweiligen Reaktionsansätzen ein Aliquot (10 μ l) mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Oxylipin-Addukte wurden anhand vier charakteristischer „Multiple-Reaction-Monitoring“ (MRM) Übergänge identifiziert und qualitativ analysiert (PPA₁-GSH: *m/z* 616→598, 616→308, 616→273, 616→179; OPDA-GSH: *m/z* 600→308, 600→293, 600→275, 600→179).

II.11 Nachweis der Oxylipin-vermittelten Expressionsaktivität

II.11.1 Das Luciferasesystem

Die Verwendung der Luciferase (LUC) als Reporter erlaubt die Erfassung zeitlicher und räumlicher Informationen über die Aktivität eines Promotors. *In vivo* kann die Lumineszenz desselben Individuums über mehrere Stunden mehrmals gemessen werden. Hierdurch lässt sich die Dynamik der Genexpression ermitteln. In Abwesenheit des Substrats ist die LUC sehr stabil. Erst mit der Zugabe des Substrates Luciferin verliert LUC seine Enzymaktivität mit einer Halbwertszeit von circa zwei bis drei Stunden. LUC katalysiert in Anwesenheit von Magnesiumionen, Sauerstoff und ATP die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei kommt es zur Emission eines Photons der Wellenlänge 560 nm (SOUTHERN *et al.*, 2006). Die Visualisierung der Lichtsignale erfolgte unter Verwendung einer auf -90°C gekühlten CCD (charged coupled device)-Kamera.

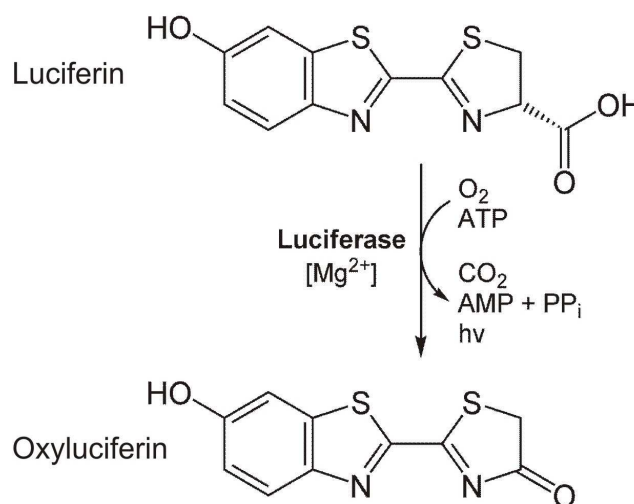


Abbildung II.3 Luciferin-Luciferase-Reaktion. Luciferin wird mit Hilfe des Enzyms Luciferase zu Oxyluciferin oxidiert, wobei eine Lichtemission stattfindet. Adenosintriphosphat (ATP) liefert die Energie für die Oxidationsreaktion; Magnesiumionen (Mg^{2+}) dienen als Cofaktor für die Luciferase.

II.11.2 Bestimmung der Expressionsaktivität mittels der *Arabidopsis thaliana* *gst6::LUC* Reportergerlinie

Zur Bestimmung der Expressionsaktivität wurde die *Arabidopsis thaliana* *gst6::LUC* Reportergerlinie verwendet. Dazu wurden zehn Tage alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (vgl. II.2.3) mit den jeweiligen Testsubstanzen (PPA_1 , OPDA, JA und PGA_1) durch direkte Zugabe in das MS-Medium behandelt. Die zu testenden Substanzen lagen in einer Endkonzentration von 75 μM mit einem methanolischem Anteil von 2% vor. Um eine Methanol-vermittelte Expressionsaktivität auszuschließen wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit 2%igem Methanol behandelt. Die Substratlösung (1mM Luciferin, 1mM Adenosintriphosphat-Magnesiumsalz (Mg^{2+} ATP), 0.01% (v/v) Triton X100) wurde eine Stunde

nach der Behandlung zugegeben. Zu Beginn der Messung wurde zur Überprüfung der verwendeten Kameraeinstellung ein Auflichtbild gespeichert (Exposure time: 150 ms, Binning: 4, Live Bin 4, Autoscale: on, Setting Brightfield, Light: on). Im Anschluss daran wurde die Expressionsaktivität über einen Zeitraum von 14 Stunden im Aufnahmenmodus (Exposure time 10 min, Binning 4, Live Bin 4, Autoscale: on, Setting, Luminescence, Light: off) mittels einer CCD-Kamera dokumentiert.

III. Ergebnisse

III.1 Biologische Aktivität von Phytoprostanen in *Arabidopsis thaliana*

III.1.1 Regulation der Genexpression

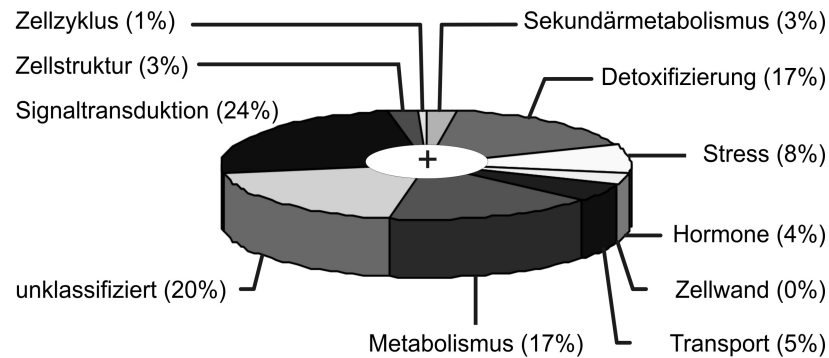
III.1.1.1 Zellkultur

Microarray-Analysen von *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen wurden am Lehrstuhl bereits in der Vergangenheit verwendet, um die biologische Aktivität des Cyclopentenon Phytoprostans PPB₁ zu untersuchen (LOEFFLER *et al.*, 2005). Der durchgeführte Array umfasste mit 626 Detoxifizierungs- und Abwehrgenen sowie 50 Genen des Sekundärmetabolismus allerdings nur drei Prozent des gesamten *Arabidopsis thaliana* Genoms. Eine heterotrophe *Arabidopsis thaliana* Zellkultur wurde mit zwei verschiedenen Regioisomeren (Typ I und II) von B₁-Phytoprostanen (75 µM) behandelt. Dabei zeigte sich, dass neben Genen, die an der Biosynthese des Sekundärmetaboliten Camalexin beteiligt sind, Detoxifizierungs- und Abwehrgene induziert wurden (LOEFFLER *et al.*, 2005).

Die vorliegende Arbeit nutzt die Microarray-Technik, um mit dem Affymetrix Chip ATH1, der mit 22500 Genen das gesamte Genom von *Arabidopsis thaliana* repräsentiert, ein umfassendes Bild des Genexpressionprofils nach Behandlung mit A₁-Phytoprostanen (PPA₁) in einer mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur zu erhalten. Nach vierstündiger Behandlung mit PPA₁ ist die Expression von 926 Genen mehr als zweifach reguliert, die von 368 Genen mehr als dreifach. Dies entspricht vier, beziehungsweise zwei Prozent des gesamten *Arabidopsis thaliana* Genoms. Für die sich anschließenden Arbeiten wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, deren Expression mehr als dreifach reguliert waren. Die statistische Auswertung der Microarrays erfolgte durch die Microarray Facility an der Universität Tübingen (siehe Material und Methoden II.6.17). Für die Zusammenfassung in funktionelle Gruppen der differentiell exprimierten Gene wurden die Programme *MapMan* (THIMM *et al.*, 2004) und *NetAFFX* (USADEL *et al.*, 2005) verwendet. Die Klassifizierung der mehr als dreifach regulierten Gene ist in Abbildung III.1 gezeigt. Die funktionelle Klassifizierung der mehr als dreifach induzierten Gene zeigte, dass etwa 20 Prozent der induzierten sowie 34 Prozent der reprimierten Gene (noch) nicht-klassifizierte Proteine kodieren. Des Weiteren waren 24 Prozent des induzierten bzw. reprimierten Expressionsprofils Genen zugeordnet, die Proteine der Signaltransduktion (Transkriptionsfaktoren, Phosphatasen und Kinasen) kodieren. Induzierte und reprimierte Gene unterscheiden sich bezüglich ihrer funktionellen Klassifizierung erheblich. Während induzierte Gene, im Vergleich zu den reprimierten Genen, in einem höheren Maße für putative Proteine des Sekundärstoffwechsels (3 Prozent), der Detoxifizierung (17 Prozent, [Cytochrom-P450-Monooxygenasen, Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucosyltransferasen, ABC-Transporter]) und

weiterer Stressreaktionen (8 Prozent) wie z.B. Hitzeschockproteine kodieren (siehe Tabelle III.1), sind reprimierte Gene im Vergleich zu den induzierten Genen hauptsächlich dem Zellzyklus (3 Prozent) bzw. dem Zellwachstum (10 Prozent) zugeordnet. Sie kodieren z.B. Cycline, Zellwand-Biosyntheseenzyme und Proteine, die an der Auxinantwort beteiligt sind (siehe Tabelle III.2).

A



B

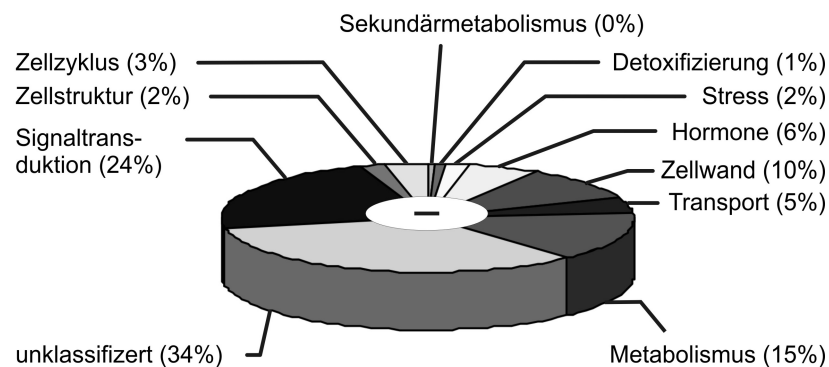


Abbildung III.1: Funktionelle Klassifizierung der Gene, deren Expression durch Phytoprostan A₁ (PPA₁) induziert (A) bzw. reprimiert (B) wird. Insgesamt wurde die Expression von 368 Genen mehr als dreifach reguliert. Davon wurden 157 Gene durch PPA₁ induziert (A) und 211 Genen reprimiert (B).

Tabelle III.1: Liste von Genen, die nach vierstündiger Behandlung mit PPA₁ mehr als dreifach induziert (I) bzw. reprimiert (II) wurden. Aufgeführt sind die Verhältnisse der relativen Hybridisierungssignale, basierend auf behandelter *Arabidopsis thaliana* Zellkultur (für vier Stunden mit 75 µM PPA₁) und kontrollbehandeltem Pflanzenmaterial (0.5% Methanol in Wasser). Die Verhältnisse wurden aus den normalisierten Genexpressionswerten des durchgeführten Microarrays kalkuliert. Die Tabelle listet nur die Verhältnisse der signifikant differentiell exprimierten Gene (P<0.05) auf. In den Spalten werden der Genlokus (MIPSCode), die Verhältnisse der Genexpressionswerte (Induktion), der P-Wert und die funktionelle Beschreibung aufgelistet. Die aufgeführten Genexpressionswerte können teilweise mehreren Genen zugeordnet werden. Dies lässt sich durch die Existenz homologer Sequenzbereiche zwischen einzelnen Genen erklären. Aufgrund dieser redundanten Bereiche ist es nicht in allen Fällen möglich, zwischen unterschiedlichen Genvarianten zu unterscheiden.

Tabelle III.1: Gene, die nach vierstündiger Behandlung mit PPA₁ mehr als dreifach induziert wurden.

Gene	Induktion	P	Beschreibung
At3g28740	205.2	0.003	cytochrome P450 family protein (CYP81D11)
At3g14660	46.4	0.015	cytochrome P450, putative
At3g14650			
At1g13080	11.4	0.045	cytochrome P450 family protein
At3g14690	11.1	0.012	cytochrome P450, putative
At3g14650			
At3g14640			
At3g14620	8.2	0.018	cytochrome P450, putative
At3g03470	3.1	0.025	cytochrome P450, putative
At4g34131	105.4	0.005	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family (UGT73B2)
At4g34135			
At1g05560	15.5	0.010	UDP-glucose transferase (UGT75B2)
At4g01070	4.2	0.038	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family
At2g30140	3.7	0.005	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family
At1g17170	61.7	0.021	glutathione S-transferase, putative (GSTU24)
At2g47730	22.6	0.020	glutathione S-transferase 6 (GST6)
At1g17180	17.0	0.041	glutathione S-transferase, putative
At1g74590	12.9	0.006	glutathione S-transferase, putative
At1g78340	6.5	0.024	glutathione S-transferase, putative
At2g29420	4.8	0.010	glutathione S-transferase, putative
At2g29460	3.7	0.050	glutathione S-transferase, putative
At1g78380	3.0	0.007	glutathione S-transferase, putative (GSTU19)
At1g76680	3.3	0.011	12-oxophytodienoate reductase (OPR1/OPR2)
At1g76690			
At1g15520	24.5	0.006	ABC transporter family protein (PDR12)
At1g02530	10.5	0.017	multidrug resistance P-glycoprotein, putative
At1g02520			
At3g47780	9.6	0.019	ABC transporter family protein

Gene	Induktion	P	Beschreibung
At2g47000	8.7	0.037	multidrug resistant (MDR) ABC transporter, putative
At3g47730	8.2	0.018	ABC transporter family protein
At2g34660	6.9	0.006	glutathione S-conjugate ABC transporter (MRP2)
At1g30400	5.9	0.011	glutathione S-conjugate ABC transporter (MRP1)
At3g55090	3.7	0.05	ABC transporter family protein
At3g21250	3.3	0.03	ABC transporter family protein
At2g29500	57.8	0.005	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)
At4g36990	12.3	0.005	heat shock factor protein 4 (HSF4)
At3g12580	5.4	0.049	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative
At3g23990	3.5	0.025	chaperonin (CPN60) (HSP60)
At1g56300	3.5	0.043	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
At4g20860	25.7	0.003	FAD-binding domain-containing protein
At1g32350	22.1	0.017	alternative oxidase, putative (AOX3)
At4g01870	20.1	0.006	TolB protein-related
At4g37990	15.0	0.012	mannitol dehydrogenase, putative (ELI3-2)
At5g16980	9.5	0.008	NADP-dependent oxidoreductase, putative
At2g39200	7.1	0.009	seven transmembrane MLO family protein / (MLO12)
At1g75280	5.5	0.009	isoflavone reductase, putative
At3g05360	4.9	0.006	disease resistance family protein / LRR family protein
At3g13610	4.3	0.023	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
At5g15870	3.7	0.04	glycosyl hydrolase family 81 protein
At5g16970	3.3	0.019	NADP-dependent oxidoreductase, putative
At5g16980			
At5g16990			
At5g17000			
At5g37980	3.0	0.038	NADP-dependent oxidoreductase, putative

Tabelle III.2: Gene, die nach vierstündiger Behandlung mit PPA₁ mehr als dreifach reprimiert wurden.

Gene	Induktion	P	Beschreibung
At3g11700	-5.1	0.026	beta-Ig-H3 domain-containing protein / fasciclin domain-containing protein
At1g44110	-4.4	0.013	cyclin, putative
At1g08560	-4.0	0.016	syntxin-related protein KNOLLE (KN) / syntxin 111 (SYP111)
At5g23860	-3.8	0.025	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)
At4g03620	-3.7	0.018	myosin heavy chain-related
At3g12110	-3.6	0.028	actin 11 (ACT11)
At4g34160	-3.5	0.031	cyclin delta-3 (CYCD3)
At1g18370	-3.2	0.011	kinesin motor family protein (NACK1)
At1g76540	-3.1	0.023	cell division control protein, putative
At3g11520	-3.1	0.027	cyclin, putative (CYC2)
At5g09870	-5.3	0.025	cellulose synthase, catalytic subunit, putative
At2g23130	-5.2	0.022	arabinogalactan-protein (AGP17)
At1g70710	-5.1	0.045	endo-1,4-beta-glucanase (EGASE) / cellulose
At4g12730	-5.1	0.018	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA2)

Gene	Induktion	P	Beschreibung
At5g57560	-5.1	0.023	endo-xyloglucan transferase (TCH4)
At4g28250	-4.9	0.023	beta-expansin, putative (EXPB3)
At3g02120	-4.6	0.035	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family
At3g62110	-4.5	0.006	Protein
At4g38400	-4.4	0.015	expansin family protein (EXPL2) glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family
At3g15720	-4.4	0.028	Protein glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family
At3g06770	-4.1	0.029	protein
At3g03050	-4.0	0.027	cellulose synthase family protein (CslD3)
At1g02730	-3.7	0.006	cellulose synthase family protein
At5g64740	-3.1	0.046	cellulose synthase, catalytic subunit, putative
At1g15580	-10.1	0.025	indoleacetic acid-induced protein 5 (IAA5) / auxin-induced protein (AUX2-27)
At1g23080	-6.8	0.013	auxin efflux carrier protein, putative
At4g32280	-5.2	0.013	auxin-responsive AUX/IAA family protein
At1g73590	-4.3	0.049	auxin efflux carrier protein, putative (PIN1)
At5g65670	-4.1	0.013	indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)
At5g43700	-3.8	0.016	indoleacetic acid-induced protein 4 (IAA4) / auxin-induced protein (AUX2-11)
At1g04240	-3.4	0.024	indoleacetic acid-induced protein 3 (IAA3)
At2g33310	-3.2	0.036	indoleacetic acid-induced protein 13 (IAA13)
At3g62100	-3.2	0.028	auxin-responsive protein, putative
At4g28640	-3.1	0.025	indoleacetic acid-induced protein 11 (IAA11)

Tabelle III.3: Vergleich des PPA₁-vermittelten Genexpressionsprofils mit den Genexpressionsprofilen, die durch andere Oxylipine (OPDA und MeJA), Stressfaktoren (Benzoxazolin, Ozon) und Pathogene (*Pseudomonas syringae* und *Botrytis cinerea*) vermittelt wurden. Angegeben ist der prozentuale Gehalt ko-regulierter Gene, die mehr als dreifach induziert wurden.

Behandlung	% ko-regulierter Gene
<i>Pseudomonas syringae</i>	50
<i>Botrytis cinerea</i>	38
Methylasmonat (MeJA)	3
12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA)	42 ¹
Benzoxazolin	28 ²
Ozon	42

¹ ausgehend von den publizierten Daten von TAKI *et al*, (2005)

² ausgehend von den publizierten Daten von BAERSON *et al*, (2005)

III.1.1.2 Vergleich des Wirkprofils von PPA₁ mit den Wirkprofilen anderer Oxylipine

In weiterführenden Experimenten sollte das PPA₁-vermittelte Transkriptionsprofil mit den Transkriptionsprofilen, die durch weitere oxygenierte Fettsäuren (Oxylipine) vermittelt wurden, verglichen werden. Hierfür wurde die Induktion von 13 ausgewählten Detoxifizierungs- und Abwehrgenen durch die Oxylipine PPA₁, PPB₁, dPPJ₁, OPDA und JA mittels Northern-Blot analysiert. Die ausgewählten Gene umfassten mit Cytochrom-P450-Monooxygenasen, UDP-Glycosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, Oxidoreduktasen und ABC-Transportern die Phasen I bis der III der Detoxifizierung sowie relevante Stressgene (Hitzeschockproteine, *ELI3*, Alternative Oxidase und *TolB-related*) (Abbildung III.2). Die im Microarray Experiment gefundene Induktion von 13 PPA₁-regulierten Genen konnte in den Northern-Blot-Analysen bestätigt werden. Darüber hinaus wurden alle getesteten Gene auch durch weitere Oxylipine induziert. Es ergab sich jedoch kein homogenes Expressionsmuster nach Oxylinbehandlung. So zeigte *OPR1/2* als einziges Gen eine Induktion durch JA. Alle anderen Gene wurden nicht durch JA induziert. Dagegen wurden die Stressgene *ELI3* und *AOX3* sowohl durch PPA₁, als auch durch OPDA induziert. Die Expression der beiden getesteten Hitzeschockproteine *HSP17.6* und *HSP70* war zusätzlich zu PPA₁ durch dPPJ₁ und OPDA induziert. Am deutlichsten durch PPA₁ positiv reguliert wurden die Gene *UGT73B2*, *GST6*, *HSP17.6*, *HSP70* und *AOX3*, wohingegen die Gene *GSTU19*, *OPR1/2*, *PDR12* und *TolB* am stärksten gegenüber PPB₁ responsiv waren.

Die Geninduktion durch PPA₁ wurde mit der Genregulation durch Pathogene und anderen Stressfaktoren *in silico* mit Hilfe des „Genevestigators“ (www.genevestigator.ethz.ch) (ZIMMERMANN *et al.*, 2004) verglichen. Die größte Übereinstimmung der Genexpression bestand mit dem Expressionsmuster nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae*: die Hälfte der Gene, die durch PPA₁ mehr als dreifach induziert wurden, wird auch durch *Pseudomonas syringae* induziert. Weiterhin zeigte sich eine große Übereinstimmung des Genexpressionsprofils nach *Botrytis cinerea*-Infektion (38%) und Behandlung mit Ozon (42%) (siehe Tabelle III.3). Darüber hinaus zeigte sich eine große Übereinstimmung der PPA₁-vermittelten Genexpression mit den publizierten Daten für OPDA-responsive Gene (TAKI *et al.*, 2005). Etwa 40% der PPA₁-responsiven Gene waren auch durch OPDA positiv reguliert. Im Gegensatz dazu lag, in Übereinstimmung mit den Northern-Blot Ergebnissen, der Anteil der PPA₁-vermittelten Genexpression mit der durch JA-, bzw. Methyljasmonat (MeJA)-vermittelten Genregulation nur bei drei Prozent (siehe Tabelle III.3).

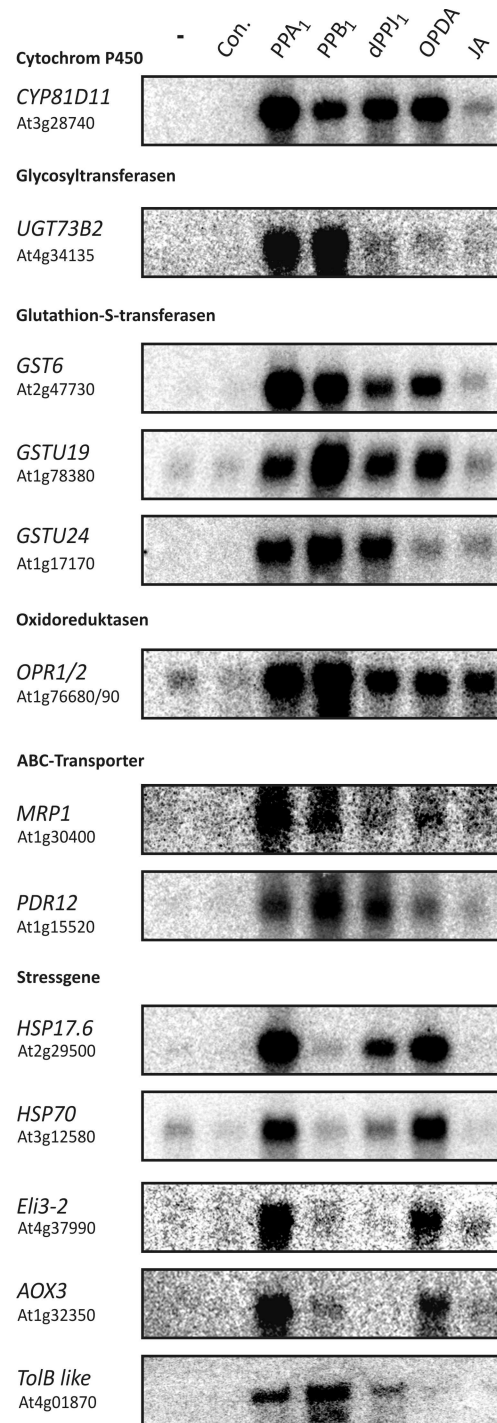


Abbildung III.2: Genexpressionsprofil ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene durch die Oxylipine PPA₁, PPB₁, dPPJ₁, OPDA und JA mittels Northern-Blot. Als Kontrolle wurde die Expression in unbehandelter (-) bzw. mit 0.5% Methanol in Wasser (Con.) behandelter *Arabidopsis thaliana* Zellkultur analysiert. Der Northern-Blot wurde mit 8 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Die Hybridisierung des Blots erfolgte mit radioaktiv markierten Sonden. Eine gleichmäßige Beladung der Blots wurde durch Visualisierung der rRNA-Banden überprüft (siehe Anhang Abbildung 1).

III.1.1.3 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Um Aussagen zur Phytoprostan-vermittelten Genexpression nicht nur in *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen, sondern auch *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zu gewinnen, wurde ein alternatives Testsystem entwickelt. In Analogie zu der Publikation von TAKI *et al.*, (2005) erwies sich die Anzucht von zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen in Flüssigmedium als besonders geeignet (siehe Material und Methoden II.3.3). Dieses Testsystem ermöglicht das Phytoprostan-vermittelte Expressionsprofil in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zu untersuchen. Zunächst sollte das durch Phytoprostan-A₁ vermittelte Expressionsprofil von zehn Tage-alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit dem durch die Microarray Analyse erhaltenen Expressionsprofil in der mixotrophen Zellkultur verglichen werden. Hierfür wurde wiederum eine Transkriptomanalyse in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nach Behandlung mit PPA₁ bzw. OPDA (75 µM) unter Verwendung des ATH1, Affymetrix Chips durchgeführt. Die Gesamtzahl an mehr als zweifach PPA₁-regulierten Genen war mit 651 Genen im Vergleich zu den durchgeführten Expressionsstudien in der mixotrophen Zellkultur mit 926 Genen geringer. Allerdings wurde auch in diesem Testsystem ein Großteil der bekannten Detoxifizierungs- und Stressgene induziert (siehe Anhang Tabelle I). Nach Stimulation mit OPDA wurden 1221 Gene mehr als zweifach reguliert. Beim Vergleich dieser Arraydaten zeigte sich, dass 42% der dreifach PPA₁-induzierten Gene ebenso durch die Behandlung mit OPDA induziert wurden (siehe Anhang Tabelle II). Des Weiteren wurde die Genexpression durch OPDA mit den publizierten Daten für OPDA-responsive Gene verglichen (TAKI *et al.*, 2005) Der Vergleich der Expressionsmuster ergab bei den mehr als dreifach induzierten Genen eine 75 prozentige Übereinstimmung. Dagegen zeigte der Vergleich der Geninduktion von PPA₁ mit den Expressionsdaten nach Behandlung mit JA nur eine Übereinstimmung von sieben Prozent. Somit liegt der Anteil an gemeinsam regulierten Genen in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen um vier Prozent höher als in der mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur. Zur Verifizierung der Microarray-Daten und zur Überprüfung des Expressionsniveaus einzelner Detoxifizierungs (*CYP81D11*, *UGT73B2*, *GST6*, *OPR1/2*)- und Stressgene (*HSP17.6*, *HSP70*, *Eli3-2*, *TolB*) wurden Northern Blot Analysen nach zwei, vier und sechs Stunden durchgeführt (Abbildung III.3).

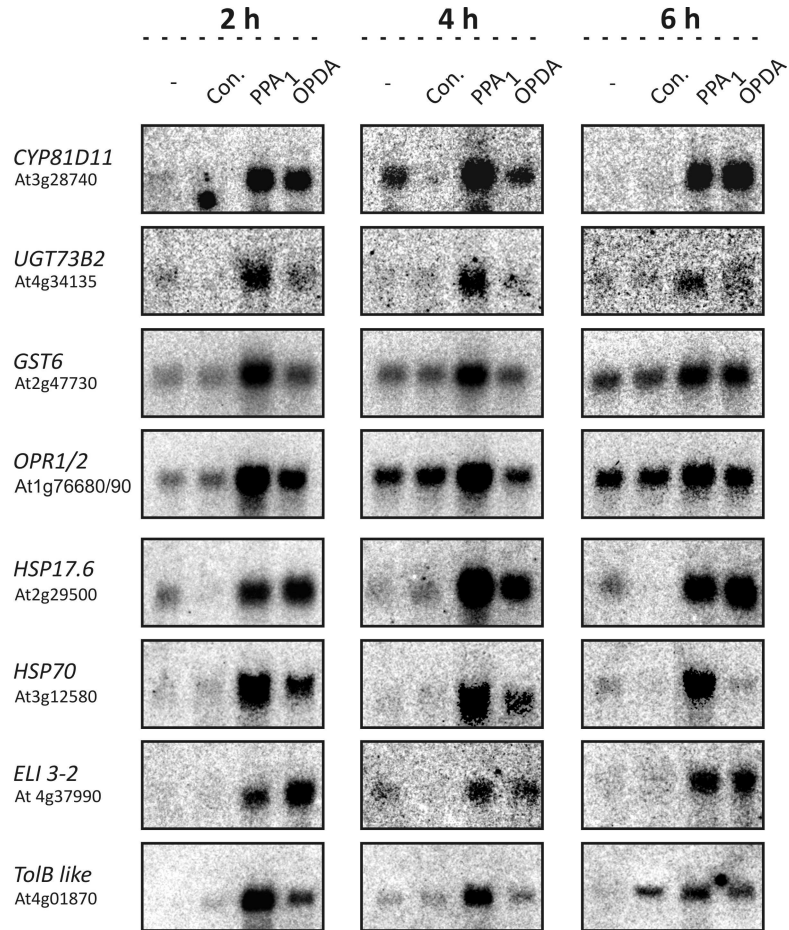


Abbildung III.3: Northern-Blot Analyse von zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zwei, vier und sechs Stunden nach Behandlung mit 75 μ M PPA₁ bzw. OPDA. Als Kontrolle wurde die Expression in unbehandelten (-) bzw. mit 0.5% Methanol in Wasser (Con.) behandelten Pflanzen untersucht. Der Northern-Blot wurde mit 8 μ g Gesamt-RNA hergestellt. Die Hybridisierung des Blots erfolgte mit radioaktiv markierten Sonden. Eine gleichmäßige Beladung der Blots wurde durch Visualisierung der rRNA-Banden überprüft (siehe Anhang Abbildung 2).

Tabelle III.4: Gene, die nach vierstündiger Behandlung mit PPA₁ oder OPDA mehr als dreifach induziert wurden. Dargestellt sind die Verhältnisse der relativen Hybridisierungssignale basierend auf behandelten (zehn Tage alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen für vier Stunden mit 75 µM PPA₁ oder OPDA) und kontrollbehandeltem (0.5% MeOH in Wasser) Pflanzenmaterial. Die Verhältnisse wurden aus den normalisierten Genexpressionswerten des durchgeführten Microarrays kalkuliert. Die Tabelle listet nur die Verhältnisse der signifikant differentiell exprimierten Gene (P<0.05) auf. In den Spalten werden der Genlocus (MIPSCode), die Verhältnisse der Genexpressionswerte (Induktion) und die funktionelle Beschreibung aufgelistet. Die gelisteten Genexpressionswerte können teilweise mehreren Genen zugeordnet werden. Dies lässt sich durch die Existenz homologer Sequenzbereiche zwischen einzelnen Genen erklären. Aufgrund dieser redundanten Bereiche ist es nicht in allen Fällen möglich, zwischen Genvarianten zu unterscheiden.

Gen	Induktion		Beschreibung
	PPA ₁	OPDA	
AT1G52560	180.7	52.26	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)
AT3G28740	100.8	71.82	cytochrome P450 family protein
AT1G16030	89.25	28.40	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative
AT5G12030	68.47	30.51	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (HSP17.7-CII)
AT1G53540	54.05	18.43	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6C-CI)
AT1G74310	49.64	13.03	heat shock protein 101 (HSP101)
AT1G17180	49.09	19.36	glutathione S-transferase, putative
AT2G15490	44.04	9.71	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein /// UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT1G59860	41.71	14.38	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)
AT1G07400			17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)
AT5G05410	38.65	11.57	DRE-binding protein (DREB2A)
AT3G46230	35.93	18.58	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)
AT1G17170	33.7	10.49	glutathione S-transferase, putative
AT1G15520	32.83	12.16	ABC transporter family protein
AT3G28210	29.55	10.44	zinc finger (AN1-like) family protein
AT1G78340	23.40	4.40	glutathione S-transferase, putative
AT4G34131	20.25	3.68	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT4G34135			UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT1G68620	19.66	19.57	expressed protein
AT1G10585	18.64	60.84	expressed protein
AT2G15490	18.44	3.30	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT2G15480			
AT4G25380	17.48	8.94	zinc finger (AN1-like) family protein
AT5G10695	16.52	6.79	expressed protein
AT5G10700			expressed protein
AT4G01870	16.27	3.34	TolB protein-related
AT5G52640	15.58	5.30	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) heat shock protein 83 (HSP83)
AT2G17500	15.15	16.03	auxin efflux carrier family protein
AT1G69930	13.47	8.39	glutathione S-transferase, putative
AT1G05560	12.79	3.34	UDP-glucose transferase (UGT75B2)
AT5G64250	12.71	3.07	2-nitropropane dioxygenase family / NPD family
AT5G59820	12.33	6.52	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT12)

Gen	Induktion		Beschreibung
	PPA ₁	OPDA	
AT1G64160	10.92	65.77	disease resistance-responsive family protein/dirigent family protein
AT2G29500	10.53	6.91	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)
AT5G13080	10.44	4.40	WRKY family transcription factor
AT3G26830	9.65	7.93	cytochrome P450 71B15, putative (CYP71B15)
AT4G12400	9.61	4.01	stress-inducible protein, putative
AT5G22300	9.32	6.64	nitrilase 4 (NIT4)
AT5G13750	9.31	5.58	transporter-related
AT5G39050	9.07	3.86	transferase family protein
AT5G48570	9.00	3.17	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506-binding, putative
AT2G29420	8.83	3.81	glutathione S-transferase, putative
AT3G24500	8.47	3.61	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative
AT4G13180	8.26	3.07	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
AT1G67810	8.23	3.88	Fe-S metabolism associated domain-containing protein
AT1G77450	8.18	5.04	no apical meristem (NAM) family protein
AT2G29460	7.84	18.25	glutathione S-transferase, putative
AT5G25930	7.83	3.36	leucine-rich repeat family protein/ protein kinase family protein
AT2G47180	7.63	9.95	galactinol synthase, putative
AT1G76520	7.39	4.97	auxin efflux carrier family protein
AT5G12020	7.26	3.83	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6-CII)
AT3G25190	6.80	3.10	nodulin, putative
AT1G30700	6.74	3.23	FAD-binding domain-containing protein
AT2G29490	6.48	3.43	glutathione S-transferase, putative
AT2G29480			glutathione S-transferase, putative
AT4G15610	6.47	3.32	integral membrane family protein
AT2G46740	6.38	8.93	FAD-binding domain-containing protein
AT1G28480	6.34	11.93	glutaredoxin family protein
AT2G47730	6.26	3.01	glutathione S-transferase 6 (GST6)
AT4G20860	5.83	3.80	FAD-binding domain-containing protein
AT3G50260	5.82	3.39	AP2 domain-containing transcription factor, putative
AT2G34500	5.76	3.76	cytochrome P450 family protein
AT5G14730	5.69	4.18	expressed protein
AT5G63790	5.67	2.10	no apical meristem (NAM) family protein
AT3G53480	5.65	6.62	ABC transporter family protein
AT1G14130	5.57	6.63	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative
AT1G66760	5.58	7.98	MATE efflux family protein
AT5G51500	5.53	4.64	pectinesterase family protein
AT3G27880	5.47	3.33	expressed protein
AT5G06860	5.46	3.36	polygalacturonase inhibiting protein 1 (PGIP1)
AT2G12190	5.38	3.28	cytochrome P450, putative
AT1G64950			cytochrome P450, putative
AT1G64940			cytochrome P450, putative
AT1G64930			cytochrome P450, putative
AT4G37990	5.25	11.29	mannitol dehydrogenase, putative (ELI3-2)
AT3G14990	5.08	3.36	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein, putative
AT3G04000	5.05	9.11	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
AT5G26340	5.04	10.52	hexose transporter, putative
AT4G02940	4.54	4.03	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein

Gen	Induktion		Beschreibung
	PPA ₁	OPDA	
AT4G05020	4.48	4.15	NADH dehydrogenase-related
AT2G37770	4.36	3.67	aldo/keto reductase family protein
AT3G46660	4.33	37.95	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT1G33110	4.18	3.20	MATE efflux family protein
AT5G04340	3.96	4.08	zinc finger (C2H2 type) family protein
AT1G22400	3.94	3.11	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT2G30140	3.75	3.63	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT3G63380	3.54	5.90	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative / Ca(2+)-ATPase, putative (ACA12)
AT1G62570	3.48	4.00	flavin-containing monooxygenase family protein/FMO family protein
AT3G11340	3.47	4.00	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
AT4G37010	3.40	3.18	caltractin, putative / centrin, putative
AT4G19230	3.38	7.09	cytochrome P450 family protein
AT1G72900	3.24	3.70	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative
AT1G76070	3.23	3.87	expressed protein
AT5G64260	3.22	4.83	phosphate-responsive protein, putative
AT3G01970	3.17	4.06	WRKY family transcription factor
AT1G71140	3.11	4.04	MATE efflux family protein
AT2G24100	3.08	3.07	expressed protein
AT5G13330	3.07	3.17	AP2 domain-containing transcription factor family protein
AT5G07440	3.01	4.53	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2)
AT1G13990	3.00	3.02	expressed protein

III.1.2 Untersuchung der Regulation der Zellteilung am Modell der BY-2-Zellen

Die vorausgegangenen Genexpressionsstudien hatten gezeigt, dass unter den reprimierten Genen zahlreiche Kandidaten zu finden waren, die dem Zellzyklus und Zellwachstum zugeordnet werden können. Um die Rolle der Oxylipine PPA₁ und OPDA bei der Regulation des Zellzyklus untersuchen zu können, wurde Tabak BY-2 Zellkultur (*Nicotiana tabacum*) als Modellsystem verwendet. Der Zellzyklus von BY-2 Zellkulturen kann mit Hilfe von Aphidicolin einem auswaschbaren Stoff, der die α -DNA-Polymerase inhibiert (IKEGAMI *et al.*, 1978), synchronisiert werden. Dazu wurden 10 ml einer Tabak BY-2 Zellkultur für 23 Stunden mit Aphidicolin behandelt. Nach Entfernung dieses Inhibitors begann ein großer Teil der Zellen die Teilung gemeinsam am G1/S-Übergang. So befanden sich neun Stunden nach der Entfernung des Inhibitors 26% der Zellen in der Mitose. Die Beurteilung der Synchronität wurde mit Hilfe des maximalen Mitose-Index durchgeführt (NAGATA *et al.*, 1992). Dazu wurden die Zellkerne der Tabak BY-2 Zellkultur mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 4',6-diamidino-2 phenylindole dichydrochloride (DAPI) und 1% Glutaraldehyd angefärbt, um das Mitosestadium der Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops zu überprüfen. Demnach beträgt die Synchronität der Zellen nach Entfernung des Inhibitors Aphidicolin 26% und nach PPA₁-, bzw. OPDA-Behandlung 7% bzw. 6% (Abbildung III.4). Um den Effekt eines möglichen Zelltodes und somit einer indirekten Mitosehemmung durch die verwendeten Oxylipine PPA₁ und OPDA auszuschließen, wurde eine Evans Blau (0.05%) Färbung durchgeführt (KADOTA *et al.*, 2004). Diese Färbung diente als spezifischer Nachweis für die Überlebensrate der BY-2 Zellen nach PPA₁- bzw. OPDA-Behandlung. Sie betrug nach PPA₁- bzw. OPDA-Behandlung jeweils ungefähr 80%, was somit eine Mitosehemmung aufgrund einer potenziellen Toxizität der Substanzen ausschließt. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PPA₁ bzw. OPDA einen hemmenden Effekt auf die Mitose und folglich auf Regulation der Zellteilung am Modell der BY-2-Zellen haben.

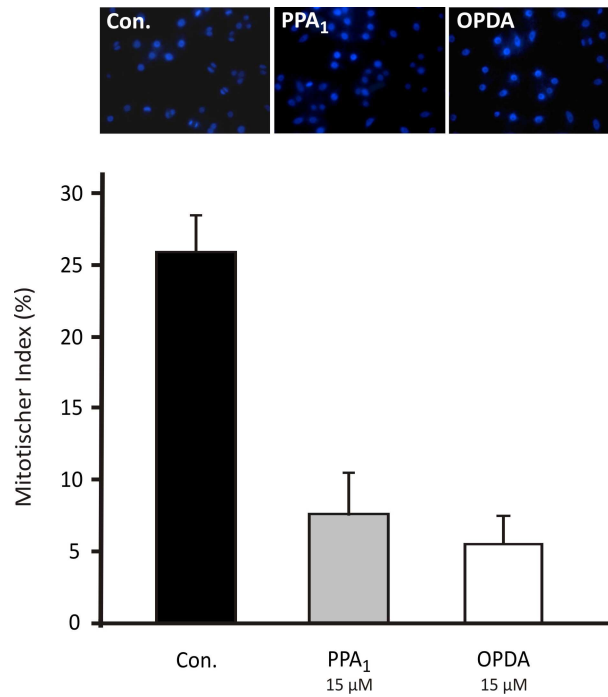


Abbildung III.4: Untersuchung der Zellteilungsregulation auf PPA₁ und OPDA. Die Beurteilung der Synchronität wurde mit Hilfe des Mitose-Index neun Stunden nach Behandlung in Abwesenheit des jeweiligen Oxylipins (Con.), PPA₁ (15 µM) und OPDA (15 µM) durchgeführt.

III.1.3 Hemmung des Wurzelwachstums

Bereits seit 1981 ist bekannt, dass JA einen hemmenden Effekt auf das Wurzelwachstum ausübt (DATHE, 1981). Um den Effekt von PPA_1 und OPDA auf das Wurzelwachstum zu untersuchen, wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Samen (Col-0) in vertikaler Ausrichtung über einen Zeitraum von acht Tagen auf MS-Medium (siehe Material und Methoden II.2.2) kultiviert, das jeweils 25 μM der zu testenden Substanzen (OPDA bzw. PPA_1) enthielt. Der Effekt auf das Wurzelwachstum wurde durch Vermessen der Wurzellänge dokumentiert. Wie Abbildung III.5 zeigt, wurde das Wurzelwachstum durch OPDA bzw. PPA_1 in unterschiedlichem Maße gehemmt. Die Wurzellänge betrug nach OPDA-Behandlung noch 28 Prozent der Wurzellänge der Kontrollpflanzen. Kultivierung auf PPA_1 -supplementiertem Medium reduzierte die Wurzellänge um 50 Prozent.

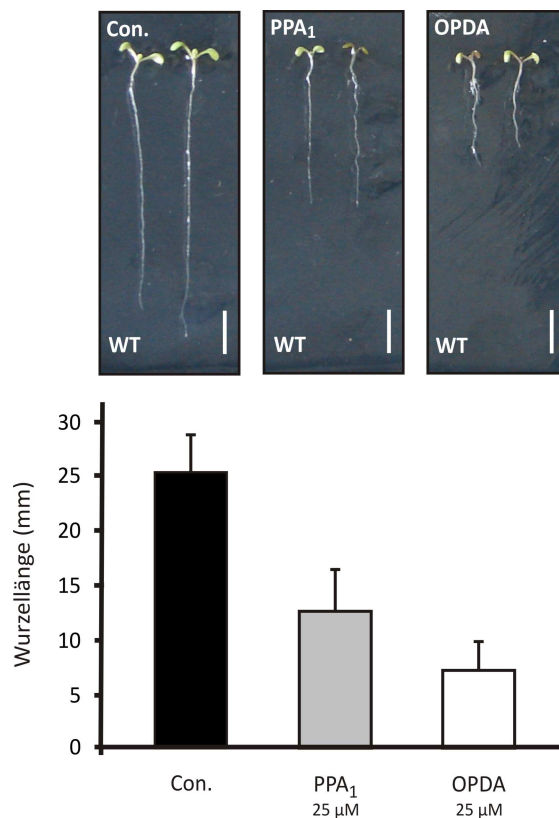


Abbildung III.5: Hemmung des Wurzelwachstums durch PPA_1 bzw. OPDA. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0)-Samen wurden acht Tage in vertikaler Ausrichtung auf MS-Medium kultiviert. Der durch das jeweilige Oxylinpin hervorgerufene Hemmeffekt wurde durch Vermessung der Wurzellänge dokumentiert. Als Kontrollbehandlung (Con.) wurde der Hemmeffekt von 0.5% MeOH (in MS-Medium) untersucht (MW \pm STABW; n = 20).

Da in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Pflanze (Col-0) OPDA enzymatisch zu JA umgesetzt werden kann, können die beobachteten Effekte auf das Wurzelwachstum auch durch JA hervorgerufen werden. Mit Hilfe der *opr3*-Mutante, die einen Defekt in der Reduktion von OPDA zu Dihydro-OPDA (OPC8:0) aufweist und somit die Metabolisierung von OPDA zu JA unterbindet,

konnten die OPDA- bzw. JA-vermittelten Effekte getrennt voneinander untersucht werden (STINTZI and BROWSE, 2000). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte ein OPDA-vermittelter Hemmeffekt ebenfalls in der *opr3*-Mutante gezeigt werden (VELLOSILLO *et al.*, 2007). Allerdings zeigte OPDA mit einer 50 prozentigen Reduktion einen geringeren Hemmeffekt in der *opr3*-Mutante als in den Wildtyp-Pflanzen, deren Wurzellänge 32 Prozent der Kontrollpflanze betrug. Die unterschiedlich starken Hemmeffekte von OPDA in Wildtyp und *opr3*-Mutante weisen auf die Beteiligung von JA bei der Wurzelwachstumshemmung hin. Die JA-vermittelte Hemmung des Wurzelwachstums war in der *opr3*-Mutante (65 Prozent) mit der Wildtyp-Pflanze (63 Prozent) vergleichbar (Abbildung III.6).

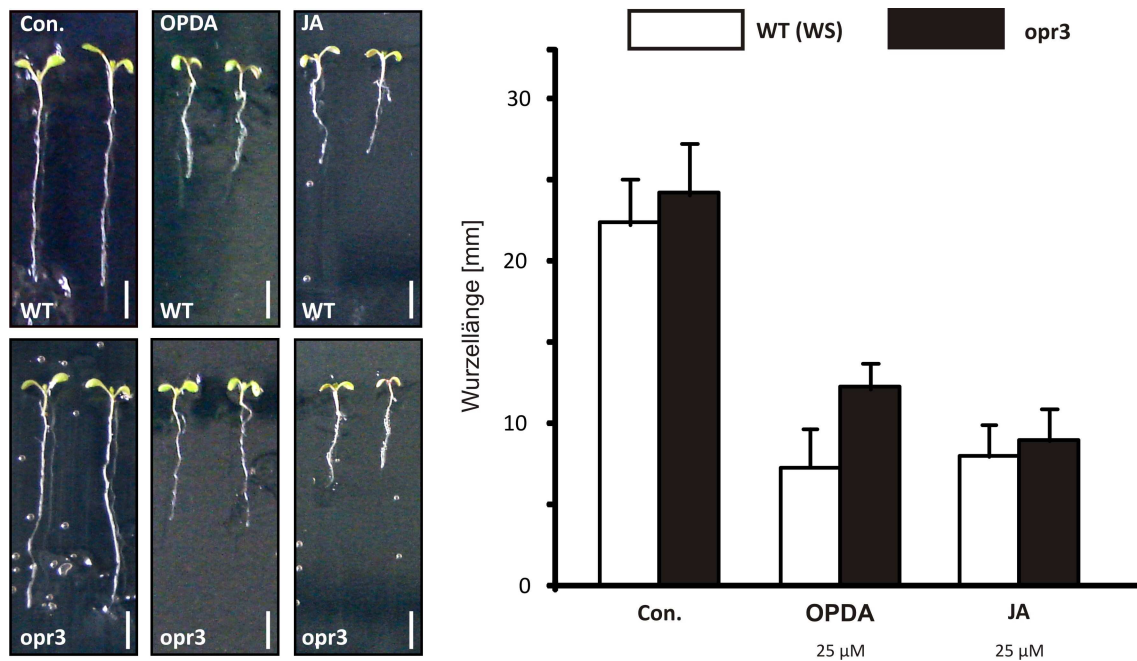


Abbildung III.6: Hemmung des Wurzelwachstums durch die beiden Oxylipine OPDA und JA. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WS) und *opr3*-Samen wurden acht Tage in vertikaler Ausrichtung auf MS-Medium kultiviert. Der durch das jeweilige Oxylin hervorgerufene Hemmeffekt wurde durch die Vermessung der Wurzellänge dokumentiert. Als Kontrollbehandlung (Con.) wurde der Hemmeffekt von 0.5% MeOH (in Wasser) untersucht (MW \pm STABW; n = 20).

III.2 Signaltransduktionsmechanismen der PPA₁- und OPDA-vermittelten Wirkungen

III.2.1 Beteiligung von COI1 an der von Oxylipinen vermittelten Wurzelwachstumshemmung

Die Prozesse der Signalweiterleitung durch die einzelne Oxylipine, wie beispielsweise OPDA und PPA₁, ihre genregulatorischen Effekte vermitteln, sind nicht vollständig verstanden. Als besonders geeignete Methode zur Aufklärung bzw. Identifikation der an der JA-vermittelten Signalweiterleitung beteiligten Faktoren erwies sich ein Verfahren, bei dem durch Selektion auf eine verringerte Methyljasmonat (MeJA)-vermittelte Hemmung des Wurzelwachstums nach Jasmonat-insensitiven Mutanten gescreent wurde. Bei diesem Verfahren wurden unter anderem die Jasmonat-insensitiven Mutanten *coi1* und *jin1* identifiziert (FEYS *et al.*, 1994; Berger, 1996 #243}. Durch die anschließende Klonierung der in den Jasmonat Signaltransduktionsmutanten betroffenen Gene erhielt man erste Erkenntnisse über Elemente dieser Signalweiterleitung. Das erste an der Jasmonatwirkung beteiligte Element, das über diese Strategie identifiziert wurde, ist COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE1) (XIE *et al.*, 1998). In Wurzelwachstumsexperimenten sollte überprüft werden, ob die PPA₁- und OPDA-vermittelte Hemmung des Wurzelwachstums, wie im Falle von JA, ebenfalls über das COI1-Signalprotein vermittelt wird. Dazu wurde der durch PPA₁- bzw. OPDA-vermittelte Hemmeffekt in der *coi1-16*-Mutante (ELLIS and TURNER, 2002) untersucht. Die Wurzellängen der *coi1-16*-Mutante entsprechen sowohl auf JA-, OPDA- bzw. PPA₁-haltigem Medium der Kontrolle. Die Ergebnisse belegen, dass die Hemmung des Wurzelwachstums durch PPA₁ bzw. OPDA wie JA über COI1 vermittelt wird (Abbildung III.7).

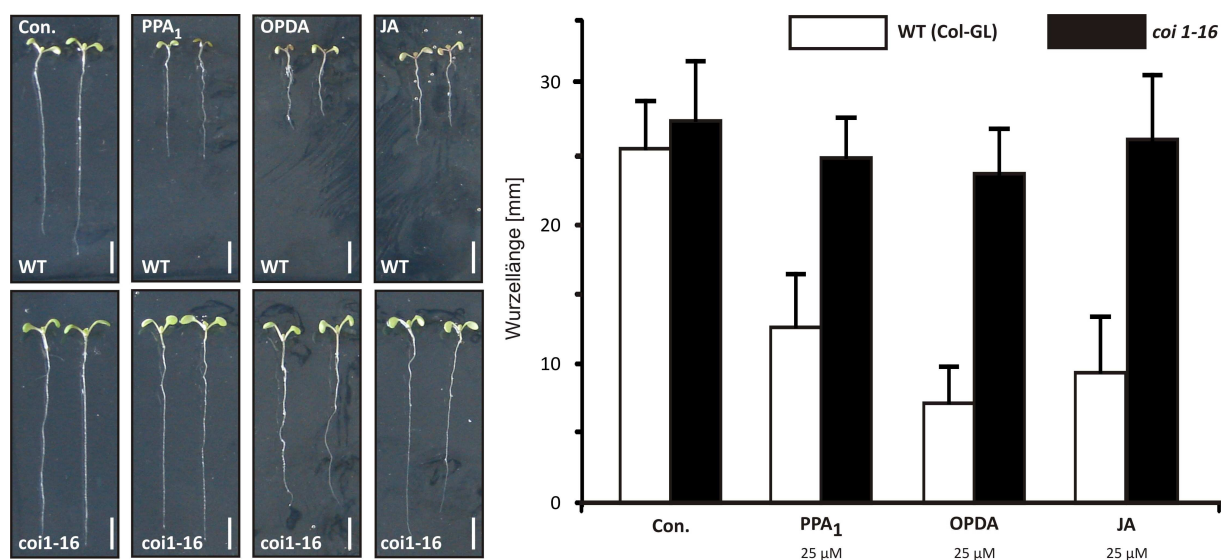


Abbildung III.7: Hemmung des Wurzelwachstums durch die Oxylipine PPA₁, OPDA bzw. JA. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (col-GI) und *coi1-16*-Samen wurden acht Tage in vertikaler Ausrichtung auf MS-Medium kultiviert. Der durch das jeweilige Oxylin hervorgerufene Hemmeffekt wurde durch Vermessen der Wurzellänge

dokumentiert. Als Kontrollbehandlung (Con.) wurde der Hemmeffekt von 0.5% MeOH (in Wasser) ermittelt ($MW \pm STABW$; $n = 20$).

III.2.2 Beteiligung von COI1 an der transkriptionellen Regulation

Die zentrale Rolle von COI1 in der JA-vermittelten Signalweiterleitung konnte bereits 2005 durch DEVOTO *et al.*, (2005) auf Transkriptomebene mittels Microarray-Analysen in der *coi1*-Mutante belegt werden (DEVOTO *et al.*, 2005). Weiterhin wurde durch Klonierung des Gens, das in der *jin1*-Mutante defekt ist, der Myc-Transkriptionsfaktor MYC2, als ein an der Jasmonat-Signaltransduktion beteiligtes Element identifiziert (LORENZO *et al.*, 2004). Dieser Transkriptionsfaktor scheint als positiver Regulator die Expression von Jasmonat-induzierten Markergenen wie VSP (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN) (LORENZO *et al.*, 2004) zu induzieren. Bei der Genexpression von Genen, die sowohl durch JA als auch durch Ethylen reguliert werden (LORENZO *et al.*, 2004), scheint MYC2 ein negativer Regulator zu sein. Der Expressionsspiegel der fünf ausgewählten Detoxifizierungs- und Stressgene *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1* und *To1B* sowie dem Jasmonat-regulierten Gen *VSP1* (LORENZO *et al.*, 2004) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR in den JA-insensitiven Mutanten *coi1-16* und *jin1* untersucht (Abbildung III.8). In Übereinstimmung mit den durchgeführten Microarray-Analysen (siehe Ergebnisse III.1) zeigten alle ausgewählten Detoxifizierungs- und Stressgene eine PPA_1 -, und OPDA-abhängige Induktion. Darüber hinaus wurden die ausgewählten Gene auch durch JA induziert. So war sowohl die Expression des Gens *VSP1* als auch die Expression der getesteten Gene *CYP81D11* und *GST25* nach Behandlung mit JA deutlich induziert. Die Expressionsspiegel dieser drei Gene war nach JA-Behandlung in der *Arabidopsis thaliana coi1* bzw. *jin1*-Mutante nur für *GST25* mit den Wildtyp-Pflanzen vergleichbar. Dagegen war die Expression von *CYP81D11* und *VSP1* in den Mutanten deutlich verringert. Somit scheinen die Signaltransduktionsfaktoren COI1 und JIN1 einen positiven Regulator bei der JA-vermittelten Expression für die beiden Gen *CYP81D11* und *VSP1* darzustellen. Die Induktion der anderen getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene war hingegen weder durch PPA_1 oder OPDA noch durch JA im Vergleich zu der *Arabidopsis thaliana coi1* und *jin1*-Mutante deutlich verändert. Um einen möglichen Metabolisierungseffekt von OPDA zu JA auszuschließen, wurde die Expressionsanalyse ebenfalls in der *opr3*-Mutante durchgeführt. Wie Abbildung III.8 zeigt, ist die OPDA- bzw. JA-vermittelte Induktion aller getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene in der *opr3*-Mutante äquivalent zur Wildtyp-Pflanze. Dies zeigt, dass der Effekt von OPDA auf die Expression dieser Gene unabhängig von der Metabolisierung zu JA ist.

Abbildung 8 (A) und (B): Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene nach Behandlung mit PPA_1 , OPDA bzw. JA (75 μ M). Als Kontrolle wurde die Expression mit 0.5% MeOH in Wasser (Con.) behandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen ermittelt. Der gemessene Expressionsgehalt wurde gegen den Expressionsspiegel von Actin 2/8 normalisiert ($MW \pm SD$, $n=3$).

Abbildung III.8 (A): Genexpressionsanalyse *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1*, *TolB* sowie *VSP1* unter Verwendung von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) Pflanzen und *Arabidopsis thaliana coi1-16* und *jin1*-Mutanten.

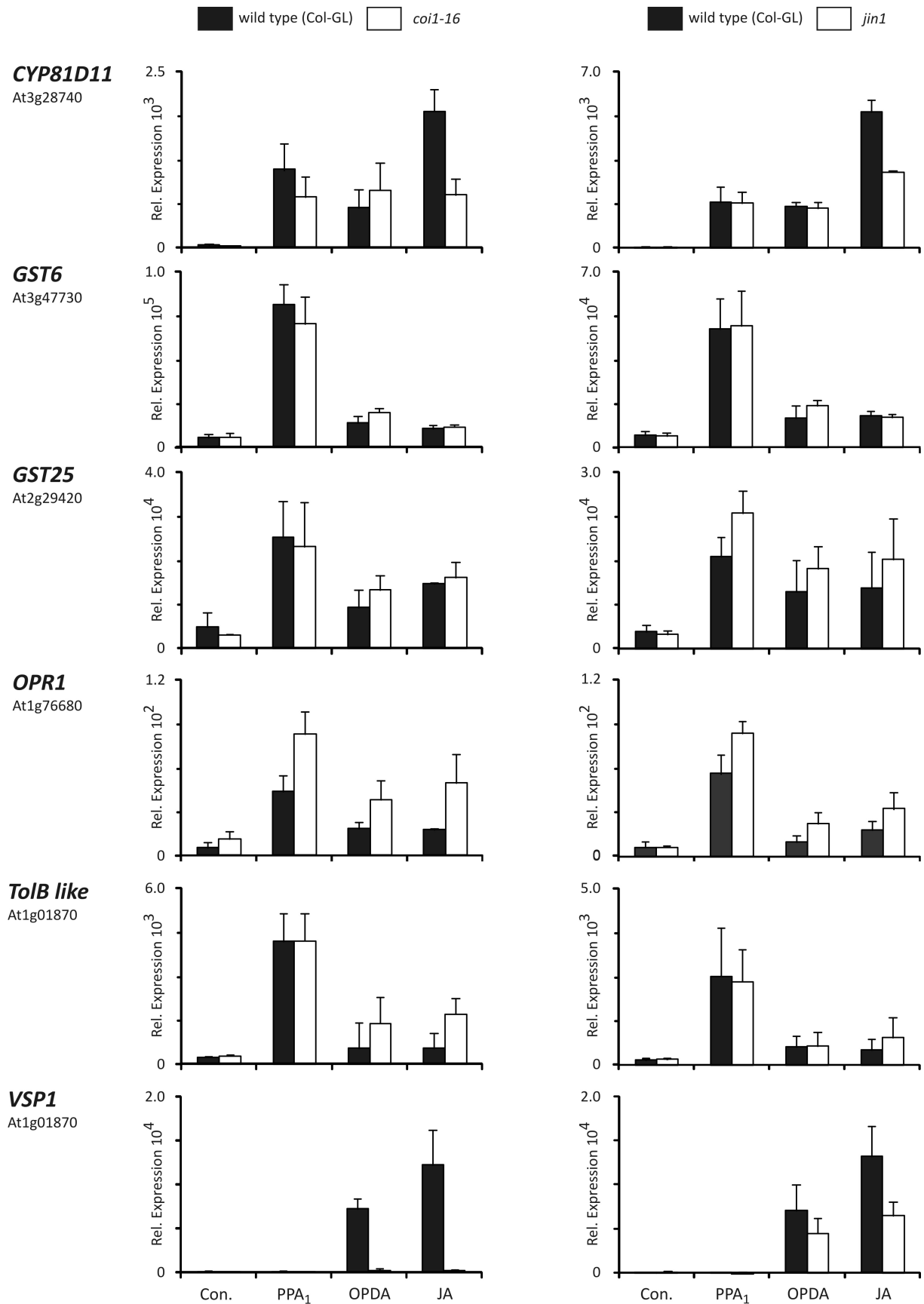
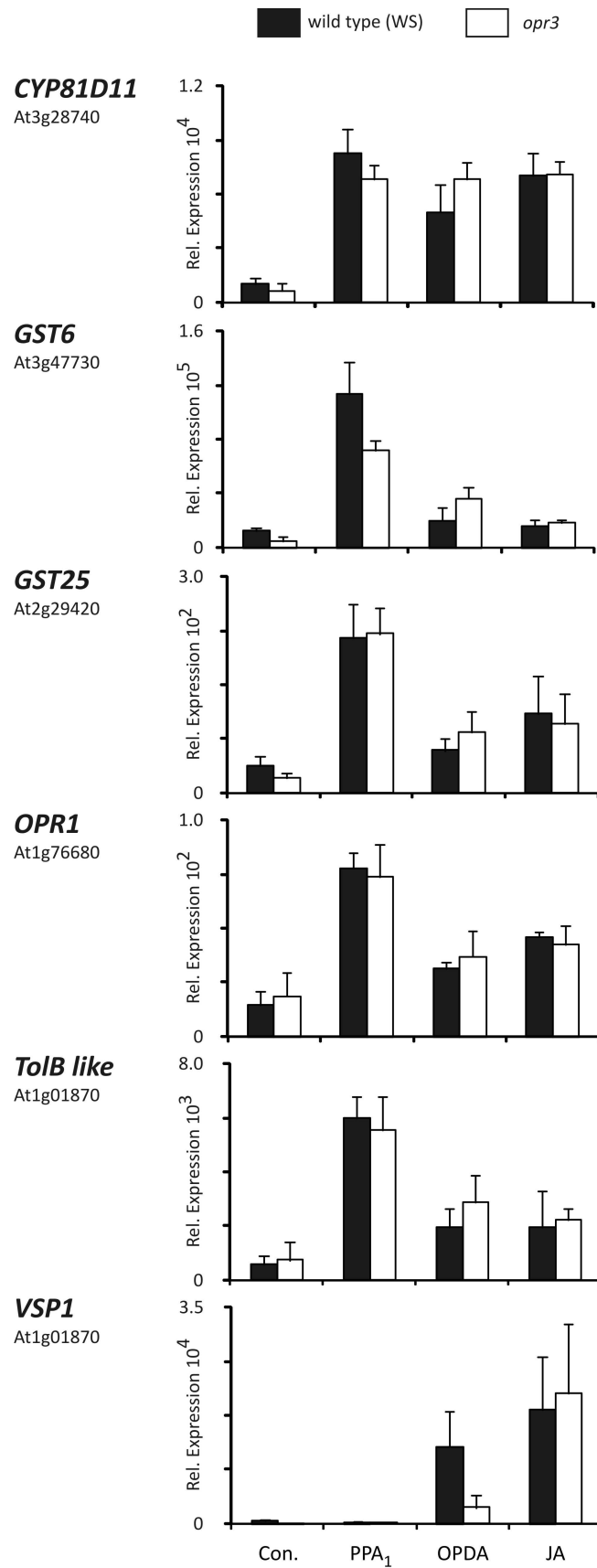


Abbildung III.8 (B): Genexpressionsanalyse *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1*, *TolB* sowie *VSP1* unter Verwendung von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WS) Pflanzen und der *Arabidopsis thaliana opr3*-Mutante.



III.2.3 Untersuchung der Beteiligung von TGA-Transkriptionsfaktoren an der Oxylin-Signalweiterleitung

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren, die am PPA₁- und OPDA-vermittelten Signalmechanismus beteiligt sind, wurden die Promotorbereiche der, durch PPA₁-Behandlung mehr als dreifach induzierten, Gene auf häufig vorhandene Sequenzmotive mit Hilfe des „Motif Analysis Tools“ der *Arabidopsis thaliana* Internetseite (TAIR) (<http://www.tair.com>) untersucht. Die Ergebnisse belegten, dass etwa die Hälfte aller mehr als dreifach PPA₁-induzierten Gene in den ersten 500 Basenpaaren ein Bindungsmotiv für TGA-Transkriptionsfaktoren (TGACG) enthalten. Um festzustellen, ob die Regulation der PPA₁- und OPDA-responsiven Gene durch TGA-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, wurde eine Transkriptomanalyse unter Verwendung des ATH1 Chip in der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *tga2tga5tga6* durchgeführt. Die Dreifach-Mutante weist einen Defekt in der Bildung der drei TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 auf. Von den 411 Genen, die in der Wildtyp-Pflanze durch PPA₁ mehr als zweifach reguliert wurden, waren 60 Prozent (247) in dieser Mutante nicht induziert. Dieses Ergebnis legt die Beteiligung von TGA2, TGA5 und/oder TGA6 an der PPA₁-Signalweiterleitung nahe. Die bioinformatische Analyse der ersten 500 Basenpaaren der Promotorbereiche von den 247 Genen, die in der Wildtyp-Pflanze und nicht in der *tga2tga5tga6* Mutante durch PPA₁ reguliert wurden, zeigte, dass 42 Prozent dieser Gene das TGA-Transkriptionsfaktor Bindungsmotiv TGACG enthalten (siehe Anhang Tabelle III). Dies bedeutet, dass 58 Prozent der TGA-abhängigen Genregulation entweder nicht über das Bindungsmotiv TGACG reguliert werden, oder alternativ indirekt durch TGA-Transkriptionsfaktoren reguliert werden, die an der Vermittlung von Phytoprostanwirkungen durch TGA2, TGA5 und TGA6 beteiligt sind.

Von den 760 Genen, deren Expression in Wildtyp-Pflanzen durch OPDA mehr als zweifach induziert waren, zeigten 30 Prozent (225) keine Induktion in der *tga2tga5tga6* Mutante, was auf eine Beteiligung von TGA-Transkriptionsfaktoren an der OPDA-Signalweiterleitung hindeutet. Neben der oben beschriebenen positiven Regulation der TGA-Transkriptionsfaktoren nach PPA₁- bzw. OPDA-Behandlung scheinen TGA2, TGA5 und TGA6 auch eine negative Regulation zu vermitteln. Dies zeigt die erhöhte Expression von mehr als 200 Genen in der *tga2tga5tga6* Mutante nach Behandlung mit PPA₁ (201 Gene) bzw. OPDA (253 Gene), die im Wildtyp nicht induziert waren (Abbildung III.9A und 9B).

Wie die Auswertung der Expression in den Kontrollbehandlungen (0.5% MeOH in Wasser) der *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und *tga2tga5tga6*-Mutante zeigt, scheinen die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 eine wichtige Komponente in der basalen Expression von Detoxifizierungs- und Stressgenen darzustellen. Die basale Expression von 86 bzw. 80 Genen zeigte eine mehr als zweifach erhöhte bzw. reprimierte Expression in den Wildtyp-Pflanzen

gegenüber der *tga2tga5tga6* Mutante (siehe Anhang Tabelle IV). Aus der Gruppe der PPA₁- und OPDA-induzierten Detoxifizierungs- und Stressgene zeigten 50% der Gene keine Induktion oder basale Expression in Abhängigkeit von TGA2, TGA5 und TGA6 (siehe Anhang Tabelle V).

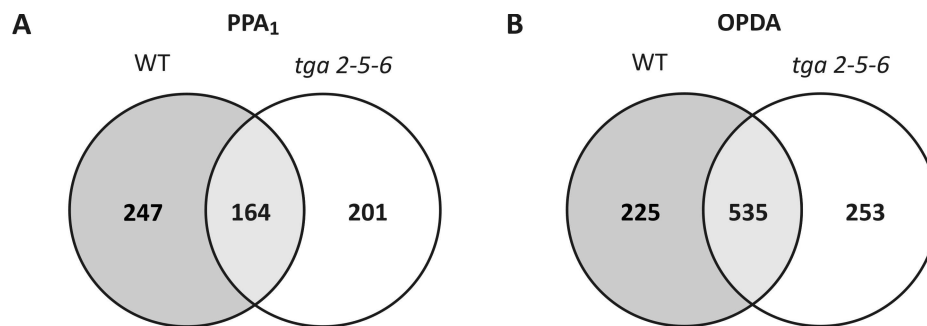


Abbildung III.9: VENN-Diagramm der durchgeführten Transkriptomanalyse von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *tga2tga5tga6* Mutanten nach PPA₁ (A) und OPDA (B) Behandlung (siehe Anhang Tabelle VI).

In *Arabidopsis thaliana* gibt es neben TGA2, TGA5 und TGA6 sieben weitere TGA-Transkriptionsfaktoren, die mit dem TGA-Bindungsmotiv TGACG interagieren (JAKOBY *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Microarray-Analyse (siehe Ergebnisse III.3.2) gezeigt werden, dass die TGA Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 an der von Phytoprostan- und OPDA-vermittelten Genexpression beteiligt sind. Ein möglicher genregulatorischer Effekt durch die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA1 und TGA4 sollte mittels quantitativer Real-Time PCR an dem Expressionsprofil der Gene *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1* und *ToIB* nach PPA₁, OPDA bzw. JA-Behandlung in der *Arabidopsis thaliana tga1tga4*-Mutante untersucht und mit dem Expressionslevel in der *tga2tga5tga6*-Mutante verglichen werden. Die Dreifach-Mutante zeigte sowohl nach PPA₁ als auch nach OPDA und JA-Behandlung eine verringerte Expression der ausgewählten Detoxifizierungs- und Stressgene *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1* und *ToIB* (Abbildung III.10). Eine TGA2, TGA5 und TGA6-abhängige Induktion nach JA-Behandlung zeigten besonders die Gene *CYP81D11* (320 fach) und *GST25* (22 fach) (Abbildung III.10). Die Expression keiner der getesteten Gene war in der *tga1tga4* Mutante erniedrigt. Vielmehr scheinen die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA1 und TGA4 negative Regulatoren auf die ausgewählten Detoxifizierungs-, und Stressgene zu sein, wodurch sich die erhöhten Expressionslevel in der *tga1tga4* Mutante erklären lassen (Abbildung III.10).

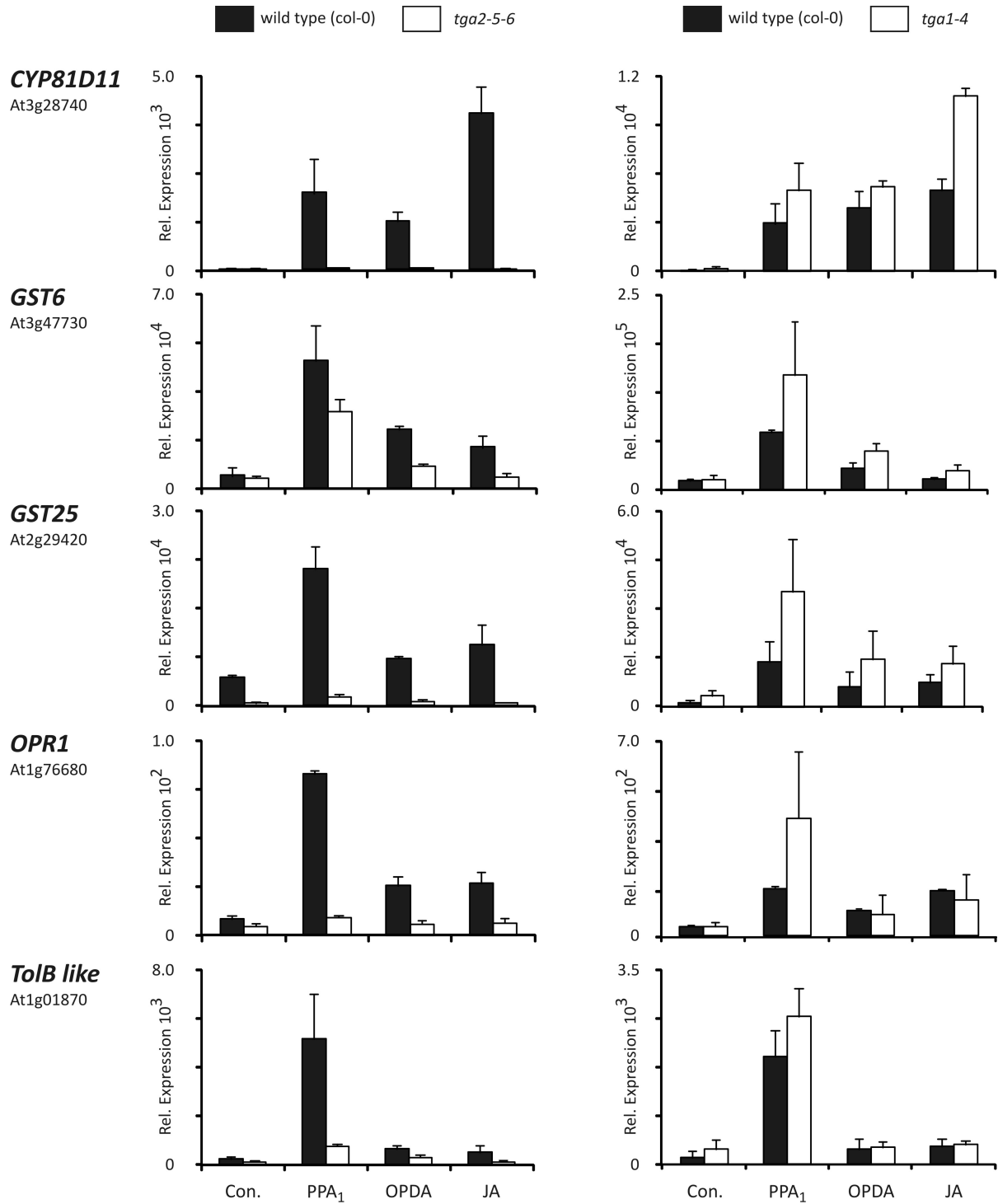


Abbildung III.10: Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene nach Behandlung mit PPA₁, OPDA bzw. JA (75 µM). Als Kontrolle wurde die Expression mit 0.5% MeOH in Wasser (Con.) behandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen analysiert. Die Genexpressionsanalyse wurde in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Pflanzen (Col-0) sowie den *tga2tga5tgat6* und *tga1tga4*-Mutanten durchgeführt. Der gemessene Expressionsgehalt wurde gegen den von Actin 2/8 normalisiert (MW ± SD, n=3).

III.2.4 Untersuchung der Beteiligung TGA-interagierender Proteine an der TGA-vermittelten Oxylin-Signalweiterleitung

III.2.4.1 Untersuchung der Beteiligung von NPR1

In *Arabidopsis thaliana* konnte NPR1 (NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED [PR] GENES) als ein Interaktionspartner von TGA-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (ZHANG *et al.*, 1999; DESPRES *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000). NPR1 ist ein Schlüsselregulator bei der Salizylsäure-induzierten Signaltransduktion, die zur Entwicklung von systemisch erworbener Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) in *Arabidopsis thaliana* führt. Um eine mögliche Beteiligung des NPR1-Proteins an der TGA-vermittelten Phytoprostan- bzw. OPDA-abhängigen Signalweiterleitung zu untersuchen, wurde mittels quantitativer Real-Time PCR der Expressionsspiegel verschiedener Detoxifizierungs- und Stressgene (*CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1* und *TolB*) in der *Arabidopsis thaliana* Mutante *npr1* untersucht. Dabei zeigten sich keinerlei Unterschiede in dem Expressionsspiegel der untersuchten Gene. Zusammenfassend gesagt ist die PPA₁, OPDA und JA TGA-abhängige Signalweiterleitung von NPR1 unabhängig (Abbildung III.11), was auf das Vorkommen von mindestens einem weiteren interagierenden Protein hindeutet.

III.2.4.2 Untersuchung der Beteiligung des SCL14-Proteins

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 an der Vermittlung von Phytoprostanwirkungen beteiligt sind. Um weitere Komponenten der Signaltransduktion Phytoprostan-vermittelter Genregulation zu identifizieren, sollten TGA2 Interaktionspartner identifiziert werden, die an der Oxylin-Signalweiterleitung beteiligt sind. Diese Studien erfolgten in Kooperation mit Frau Prof. Christiane Gatz in Göttingen. Die Arbeitsgruppe von Frau Gatz hat mittels Yeast-Two-Hybrid neben dem bekannten NPR1-Protein (ZHANG *et al.*, 1999) das Scarecrow-like14 (SCL14) Protein (FODE *et al.*, 2008) als weiteren Interaktionspartner von TGA2 identifiziert. In einer *Arabidopsis thaliana* *scl14*-Überexprimierer (*SCL-OE*)- und einer *Arabidopsis thaliana* Verlustmutante (*SCL-KO*) sollten die Effekte von SCL14 nach Oxylinbehandlung (PPA₁, OPDA bzw. JA) untersucht werden (Abbildung III.11). Die Expressionsanalysen der beiden *scl*-Mutanten zeigten eine SCL14-abhängige Genexpression von *CYP81D11* und *GST25*. *SCL-OE*-Pflanzen erhöhten die Expression dieser Gene deutlich, während die *SCL-KO*-Pflanze geringere Expressionsspiegel als die Kontrollpflanze aufwies. In Analogie zur TGA-Dreifach-Mutante vermittelte JA die stärkste Geninduktion. Weitere getestete Detoxifizierungs- und Stressgene (*GST6*, *OPR1* und *TolB*) wiesen zwar einen erhöhten Expressionsspiegel in der *SCL-OE*-Mutante auf, allerdings waren die Expressionsspiegel in der Verlustmutante (*SCL-KO*) identisch zu den Kontrollpflanzen. Daher

scheint die Regulation von *GST6*, *OPR1* und *TolB* nicht allein über das TGA-abhängige Signalprotein SCL14 gesteuert zu sein, was auf die Existenz weiterer Signalproteine hindeutet (Abbildung III.11).

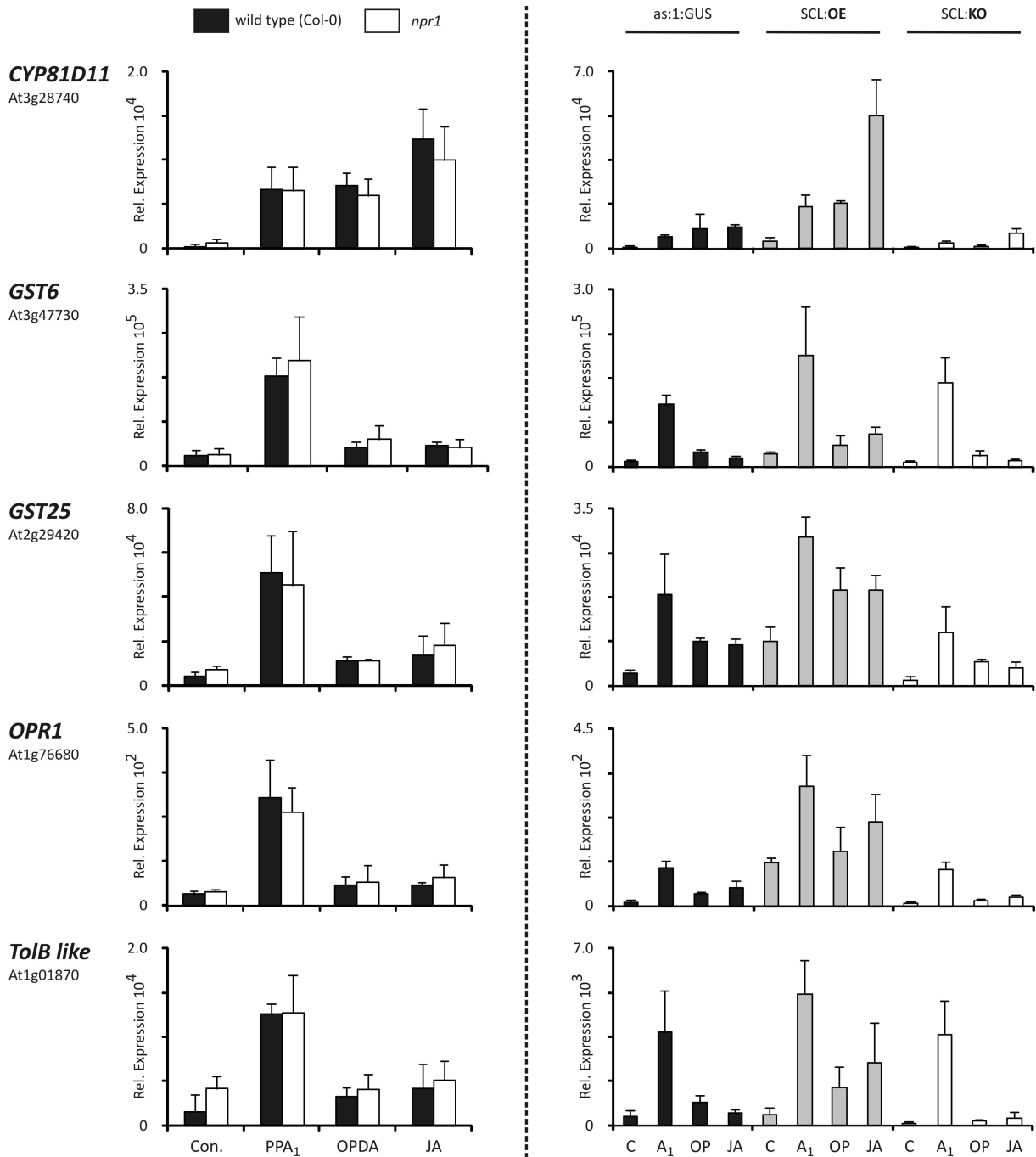


Abbildung III.11: Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR von ausgewählten Detoxifizierungs- und Stressgenen nach Behandlung mit PPA₁, OPDA bzw. JA (75 µM). Als Kontrolle wurde die Genexpression mit 0.5% MeOH in Wasser (Con.) behandelter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen analysiert. Der gemessene Expressionsgehalt wurde gegen den von Actin 2/8 normalisiert (MW ± SD, n=3). Die Genexpressionsanalyse zur Untersuchung der NPR1-Beteiligung erfolgte unter Verwendung der *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *npr1*-Mutanten. Die Untersuchung der Beteiligung des SCL14-Proteins erfolgte

unter Verwendung der *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Pflanzen (*as:1:GUS*) sowie der *sc14*-Überexpressions (*SCL-OE*) bzw. der *sc14*-Verlustmutante (*SCL-KO*).

III.2.5 Untersuchung des Wachstums der *Arabidopsis thaliana tga2tga5tga6* und *tga1tga4* Mutanten

Phytprostane sind elektrophile Substanzen, die *in vivo* durch Lipid-Peroxidation gebildet werden und einen Einfluss auf die Expression von Detoxifizierungs- und Stressgenen ausüben. *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit einem Defekt in der Tocopherol-Biosynthese (*vte*, Vitamin E) weisen bis drei Tage nach Keimung einen 100-fach erhöhten Spiegel an Phytoprostanen auf (SATTLE *et al.*, 2006). Diese *vte2*-Pflanzen sind in der frühen Keimlingsentwicklung vermehrt anfällig für oxidativen Stress. Phänotypisch zeigen diese Keimlinge ein deutlich verkürztes Wurzelwachstum (SATTLE *et al.*, 2004). Eine Transkriptomanalyse in drei Tage alten *vte2* Mutanten zeigte in Übereinstimmung mit unseren Arraydaten die Induktion von Detoxifizierungs- und Stressgenen (SATTLE *et al.*, 2006). Die Untersuchung der Expressionsspiegel von *CYP81D11*, *GST6*, *GST25*, *OPR1* und *TolB* in den *tga2tga5tga6* und *tga1tga4* Mutanten zeigte, dass die Oxylin-vermittelte Expression der getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene positiv über die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 und negativ über TGA1 und TGA4 reguliert wird. Im Folgenden sollte die Bedeutung der TGA-Faktoren während des Wachstums auf Oxylin-haltigem Medium untersucht werden. Dazu wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Mutanten-Samen (*tga2tga5tga6* und *tga1tga4*) acht Tage auf MS-Medium kultiviert, das 25 μ M PPA₁, OPDA bzw. JA enthielt. Auffallend war die bereits in der Kontrollbehandlung stark verkürzte Wurzellänge in der TGA-dreifach Mutante. Eine Wurzelwachstumshemmung war vor allem durch die beiden elektrophilen Substanzen PPA₁ und OPDA zu erkennen. Vor allem der PPA₁-vermittelte Hemmeffekt war mit 80 Prozent in der TGA-Dreifach-Mutante im Vergleich zu 50 Prozent in der Wildtyp-Kontrollpflanze deutlich erhöht (Abbildung III.12).

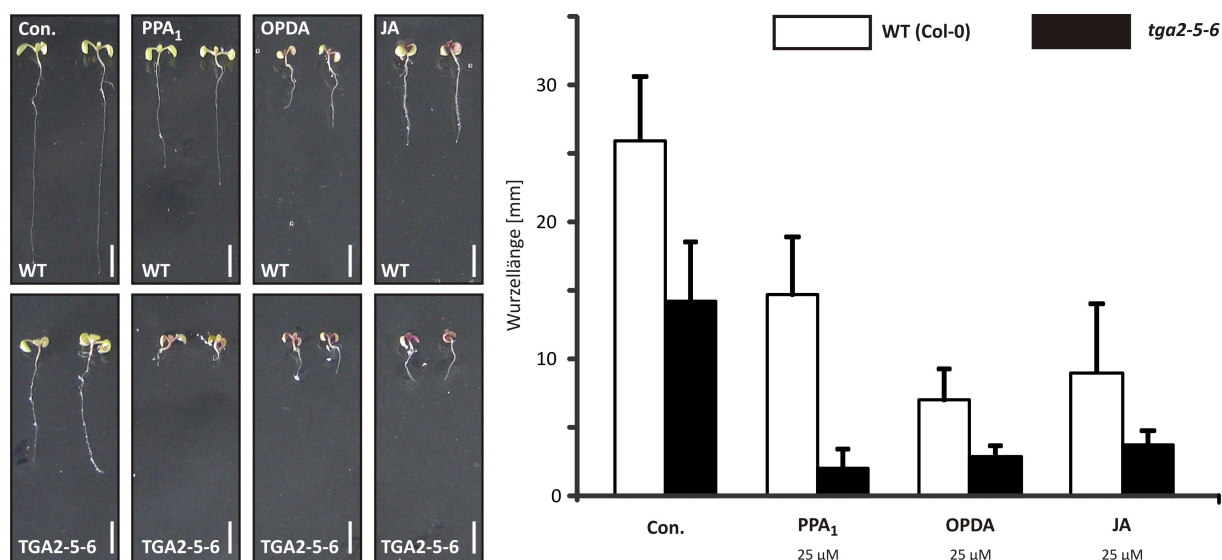


Abbildung III.12: Hemmung des Wurzelwachstums durch die Oxylipine PPA₁, OPDA bzw. JA. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *tga2tga5tga6*-Samen wurden acht Tage in vertikaler Ausrichtung auf MS-Medium kultiviert. Der durch das jeweilige Oxylin hervorgerufene Hemmeffekt wurde durch Vermessen der Wurzellänge dokumentiert. Als Kontrollbehandlung (Con.) wurde der Hemmeffekt von 0.5% MeOH (in Wasser) untersucht (MW \pm STABW; n = 20).

Die Untersuchung des Wachstums in der *Arabidopsis thaliana tga1tga4* Mutante zeigte im Vergleich zur *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanze keinen Unterschied. Somit hemmten die Substanzen PPA₁, OPDA und JA das Wurzelwachstum in der *tga1tga4*-Mutante und der Wildtyppflanze gleichermaßen (Abbildung III.13).

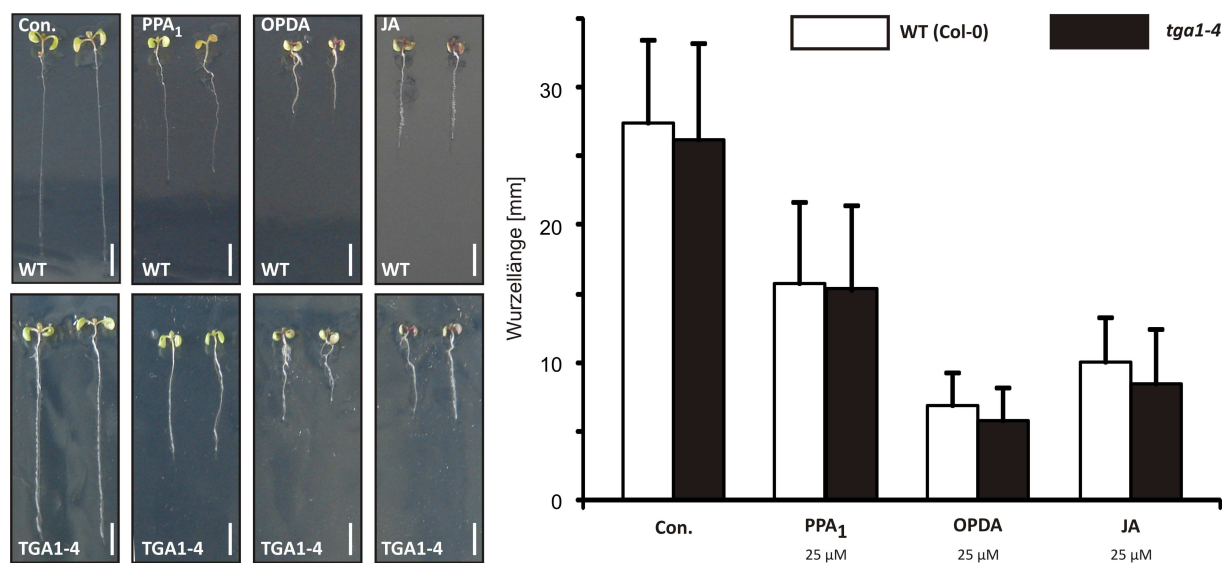


Abbildung III.13: Hemmung des Wurzelwachstums durch die Oxylipine PPA₁, OPDA bzw. JA. *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (Col-0) und *tga1tga4*-Samen wurden acht Tage in vertikaler Ausrichtung auf MS-Medium kultiviert. Der durch das jeweilige Oxylin hervorgerufene Hemmeffekt wurde durch Vermessen der Wurzellänge dokumentiert. Als Kontrollbehandlung (Con.) wurde der Hemmeffekt von 0.5% MeOH (in Wasser) untersucht (MW \pm STABW; n = 20).

III.3. Metabolisierung der Cyclopentenone PPA₁ und OPDA

Die zu den α,β -ungesättigten Ketonen zählenden Cyclopentenone PPA₁ und OPDA führen zu einer verstärkten Genexpression von Detoxifizierungs- und Stressgenen. Diese elektrophilen Ketone sind reaktive Substanzen, die leicht z.B. mit freien Thiolgruppen von cytosolischen und membrangebundenen Proteinen eine Michael-Addition eingehen können. Zu diesen Verbindungen gehören neben OPDA auch Malondialdehyd, Hydroxynonenal, Ketodiene und Cyclopentenon-Phytoprostane. Bei all diesen Verbindungen handelt es sich um Substanzen, die bei der nichtenzymatischen Lipidperoxidation von Zellmembranen gebildet werden können (VOLLENWEIDER *et al.*, 2000; THOMA *et al.*, 2003). Da diese Verbindungen eine potentielle Gefahr für die Zelle darstellen,

können sie durch Reduktion in ein Cyclopentanon (BREITHAUPT *et al.*, 2001) oder durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden (DAVOINE *et al.*, 2005; DAVOINE *et al.*, 2006).

III.3.1 Inaktivierung von PPA₁ und OPDA durch Oxidoreduktasen

III.3.1.1 Induktion von Oxidoreduktasen durch PPA₁ und OPDA

Die Reduktion elektrophiler Cyclopentenone zu Cyclopentanone durch Oxidoreduktasen ist eine Möglichkeit der Inaktivierung von reaktiven α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen. Für OPDA ist aus der JA-Biosynthese bereits bekannt, dass die Oxidoreduktase OPR3 die Umsetzung dieses Cyclopentenons zu OPC:8 katalysiert (SCHALLER *et al.*, 2000). Neben OPR3 sind in *Arabidopsis thaliana* noch zwei weitere Oxidoreduktasen, OPR1 und OPR2, die nicht an der JA-Biosynthese beteiligt sind, bekannt (SCHALLER *et al.*, 1998; SCHALLER *et al.*, 2000). Transkriptom- und Northern-Blot-Analysen zeigten eine Induktion von *OPR1/2* (At1g76680/90) durch die beiden Cyclopentenone PPA₁ und OPDA (Abbildung III.2). Die 87%ige Homologie der c`DNAs von *OPR1* und *OPR2* ließ eine Unterscheidung in den durchgeführten Microarray- und Northern-Blot-Analysen nicht zu. Aus diesem Grund wurde die PPA₁- bzw. OPDA-abhängige Genexpression von *OPR1*, *OPR2* und *OPR3* mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht. Abbildung III.14 zeigt die mRNA Spiegel von *OPR1* und *OPR2*, die durch PPA₁ zehnfach bzw. achtfach induziert wurden, wohingegen der mRNA-Gehalt von *OPR3* nicht erhöht war. Dagegen wurde durch OPDA der Spiegel an *OPR3*-mRNA achtfach, der von *OPR1* zweifach bzw. von *OPR2* vierfach erhöht (Abbildung III.14). Zusammenfassend gesagt induzieren die Cyclopentenon-Oxylipine PPA₁ und OPDA die Genexpression von OPR1 bzw. OPR3. In einem sich anschließenden Experiment sollte die Substratspezifität dieser beiden Enzyme *in vitro* charakterisiert werden. Dazu mussten jedoch zuerst die rekombinaten Proteine OPR1 bzw. OPR3 in reiner Form gewonnen werden.

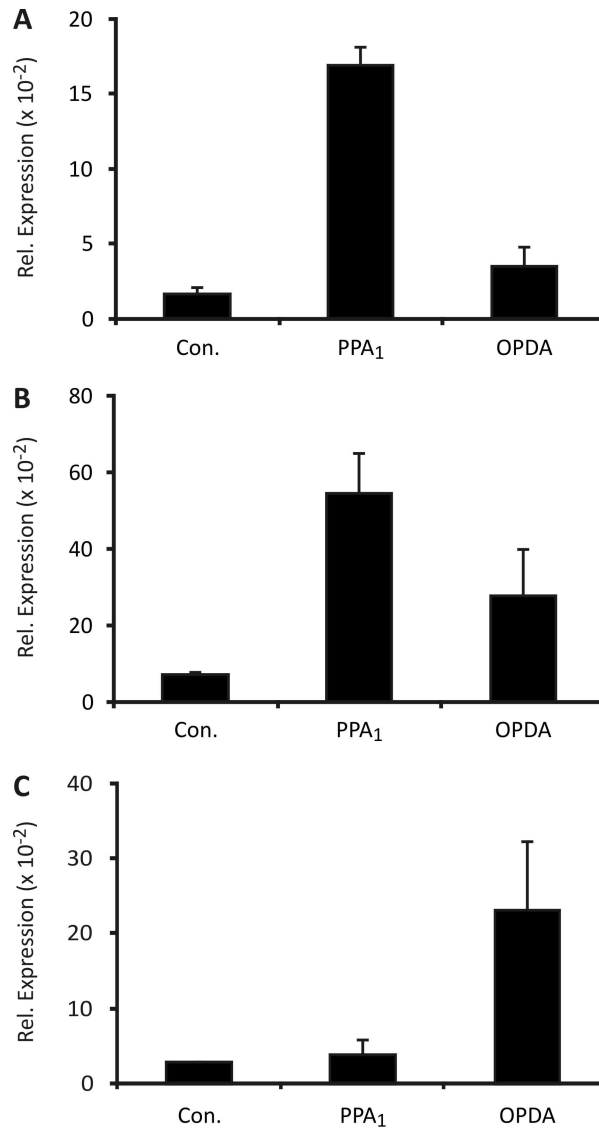


Abbildung III.14: Genexpressionsanalyse der Oxidoreduktasen OPR1 (A), OPR2 (B) und OPR3 (C) mittels quantitativer Real-Time PCR. *Arabidopsis thaliana* Zellkultur-Material wurde mit PPA₁ bzw. OPDA (75 µM) behandelt. Als Kontrollbehandlung diente 0.5% MeOH in Wasser (Con). Der gemessene Expressionsgehalt wurde gegen die Expression von Actin 2/8 normalisiert (Mittelwerte \pm SD; n=3 unabhängige Experimente).

III.3.1.2 Reinigung von OPR1his- und OPR3his-Proteinen

Die von der Arbeitsgruppe Schaller erhaltenen Expressionsvektoren pQE30-OPR1 und pQE30-OPR3 enthalten die kodierenden Sequenzen von OPR1 und OPR3 sowie den zur rekombinanten Aufreinigung notwendigen „Hexa-Histidin-Tag“ (SCHALLER and WEILER, 1997; MÜSSIG C.). Als Reinigungsstrategie für OPR1his bzw. OPR3his aus *E.coli* war eine Metall-Affinitätschromatographie vorgesehen. Die Reinigung wurde entsprechend Material und Methoden II.7.4 mit einem Proteinextrakt aus 200 ml Bakterienkultur an Nickel-TED-Silicagel durchgeführt. Rohextrakt sowie Elutionsfraktionen wurden zur Überprüfung des Reinigungserfolges über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Sowohl die Rohextrakte, als auch die Elutionsfraktionen von OPR1his bzw. OPR3his zeigten

im SDS-Page distinkte Banden. Die einzelnen Banden der jeweiligen Elutionsfraktionen, bei ca. 47 kDa auf dem Gel, repräsentierte das gereinigte OPR1his- bzw. OPR3his-Protein. Gereinigtes OPR1his bzw. OPR3his stand nun für quantitative Analysen der katalytischen Umsetzung der Cyclopentenone PPA₁ und OPDA zur Verfügung (Abbildung III.15).

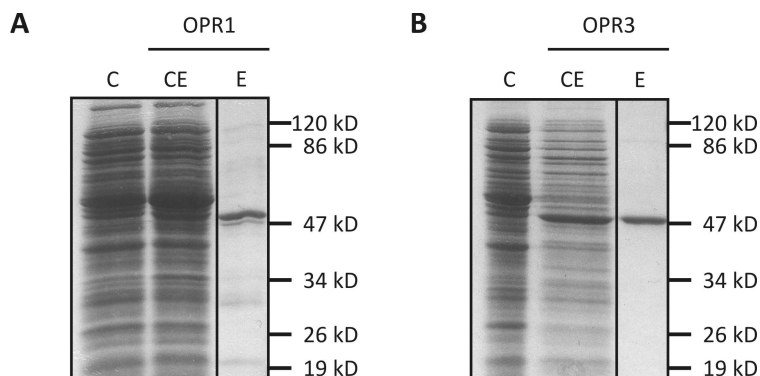


Abbildung III.15: SDS-Gelelektrophorese (12.5%) zur Überprüfung des Reinigungserfolges der Oxidoreduktasen OPR1his (A) und OPR3his (B). Die SDS-PAGE zeigt den Proteinrohextrakt (CE) sowie die Elutionsphase (E) der Affinitätschromatographie aus *E.coli*-M15, die mit dem Expressionsplasmid pQE30 (mit der jeweils kodierenden Sequenz für OPR1 bzw. OPR3) transformiert wurden. Als Kontrolle wurde der Proteinrohextrakt des M15-Stammes aufgetragen (C).

III.3.1.3 Assay zur Überprüfung der PPA₁-und OPDA-Reduktaseaktivität

Um die spezifische Aktivität der rekombinanten Oxidoreduktasen OPR1 und OPR3 zu den Substraten PPA₁ und OPDA bestimmen zu können, wurde ein Enzymassay, bei dem die Enzymaktivität durch die äquimolare Oxidation des Reduktionsäquivalents NADPH photometrisch bestimmt werden konnte (Costa *et al.*, 2000), eingesetzt. Dazu wurden im Standardtest jedes der beiden Cyclopentenone (100 µM) einzeln mit rekombinant aufgereinigtem OPR1 bzw. OPR3 (Oxidoreduktasen [10 µg]) inkubiert. Zur Kontrolle einer nicht-enzymatisch katalysierten Umsetzung wurde in einem parallelen Reaktionsansatz ohne Zugabe der Oxidoreduktasen die Oxidation von NADPH spektralphotometrisch vermessen. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 420 nm über 50 Minuten verfolgt. Die spezifische Aktivität wurde über die graphisch ermittelte Extinktionsabnahme unter Verwendung des spezifischen Extinktionskoeffizienten für NADPH ($6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in nkat/mg Protein errechnet. In Übereinstimmung mit publizierten Daten wurde OPDA durch die Oxidoreduktase OPR3 wesentlich effizienter zu Dihydro-OPDA (OPC:8) umgesetzt als mit OPR1 (Schaller *et al.*, 2000). Entsprechend betrug die spezifische Aktivität von OPR1 0.7 nkat/mg Protein und für OPR3 2.9 nkat/mg Protein. Dagegen erwies sich PPA₁ als besseres Substrat für OPR1 (7.1 nkat/mg) als für OPR3 (2.9 nkat/mg) (Abbildung III.16).

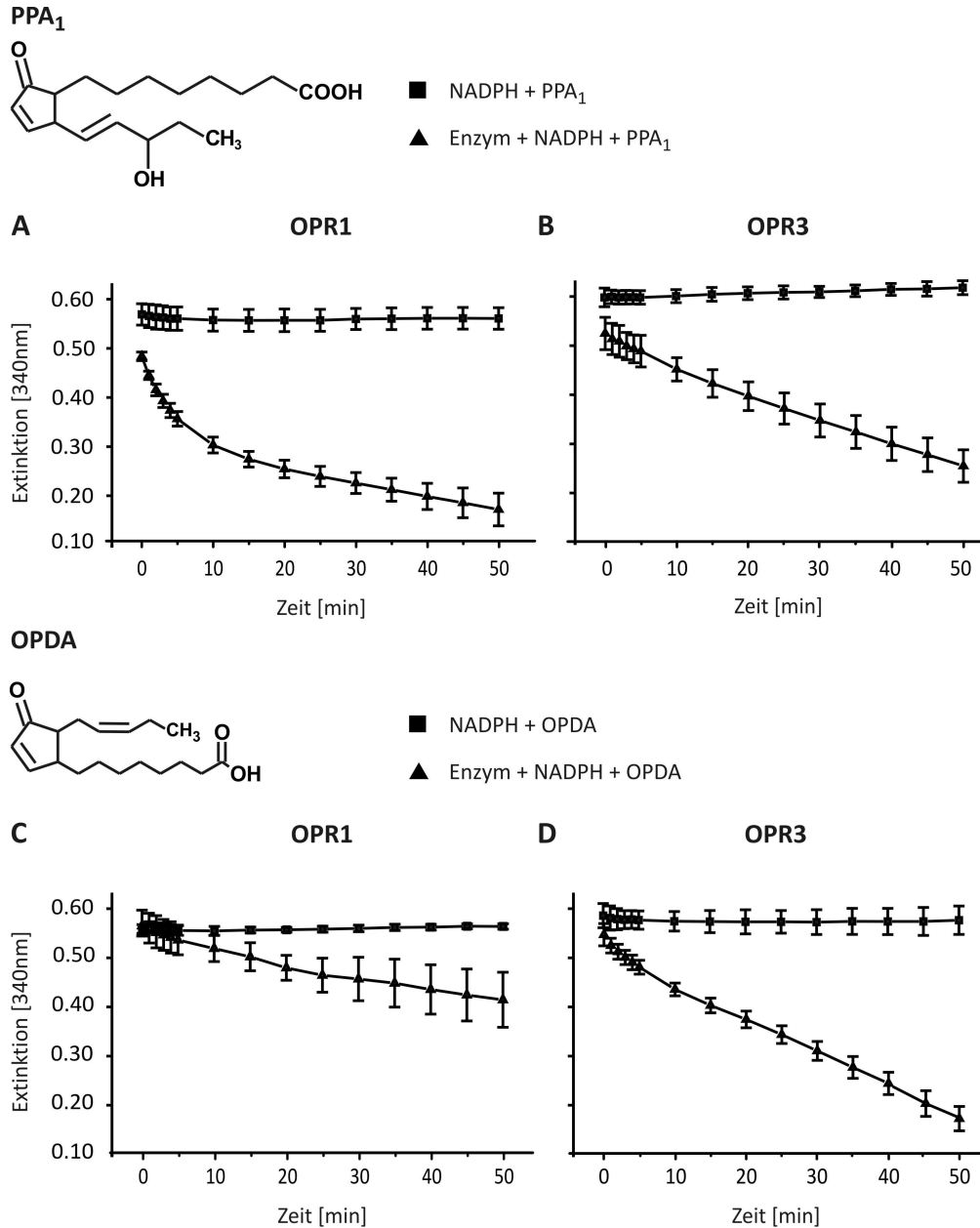


Abbildung III.16: Spektralphotometrische Analyse der enzymatischen Reduktion von PPA₁ bzw. OPDA durch OPR1 bzw. OPR3. Die Reduktion der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung von PPA₁ (A und B) bzw. OPDA (C und D) wurde mittels rekombinat aufgereinigtem Protein (OPR1 [{A} + {C}] und OPR3 [{B} + {D}]) über die Abnahme des Reduktionsäquivalenten NADPH graphisch verfolgt.

III.3.1.4 Identifizierung der Reaktionsprodukte der Oxidoreduktasen OPR1 und OPR3

Zur Identifizierung des durch die Oxidoreduktase OPR1 bzw. OPR3-entstehenden Reaktionproduktes wurden das jeweilige Substrat PPA₁ bzw. OPDA in einer Konzentration von 100 µM als Substrat in einem 250 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Der Enzymansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Umsetzung durch Zugabe von 10 µl Eisessig gestoppt. Zur Extraktion der reduzierten Verbindung und freien Säure wurde der Enzymansatz dreimal gegen 250 µl Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Nachweis der reduzierten Produkte erfolgte mittels HPLC-MS/MS im Modus der negativen Elektronenspray Ionisation (ESI). Bei dieser Ionisationstechnik liegen die Moleküle negativ geladen vor. Dadurch erniedrigt sich die Molekülmasse um eine Masseneinheit. In Abbildung III.17(A) und 17(B) sind die Fragmentspektren der Cyclopentenone mit einem Masse/Ladungsverhältnis von m/z : 307 (PPA₁) und m/z : 291 (OPDA) sowie die reduzierten Formen Dihydro-PPA₁ (DH-PPA₁) und OPC8:0 zu sehen. Durch die Reduktion der Cyclopentenone zum entsprechenden Cyclopentanon erhöhte sich die Molekülmasse um jeweils zwei Masseneinheiten (DH-PPA₁=309 und OPC8:0=293).

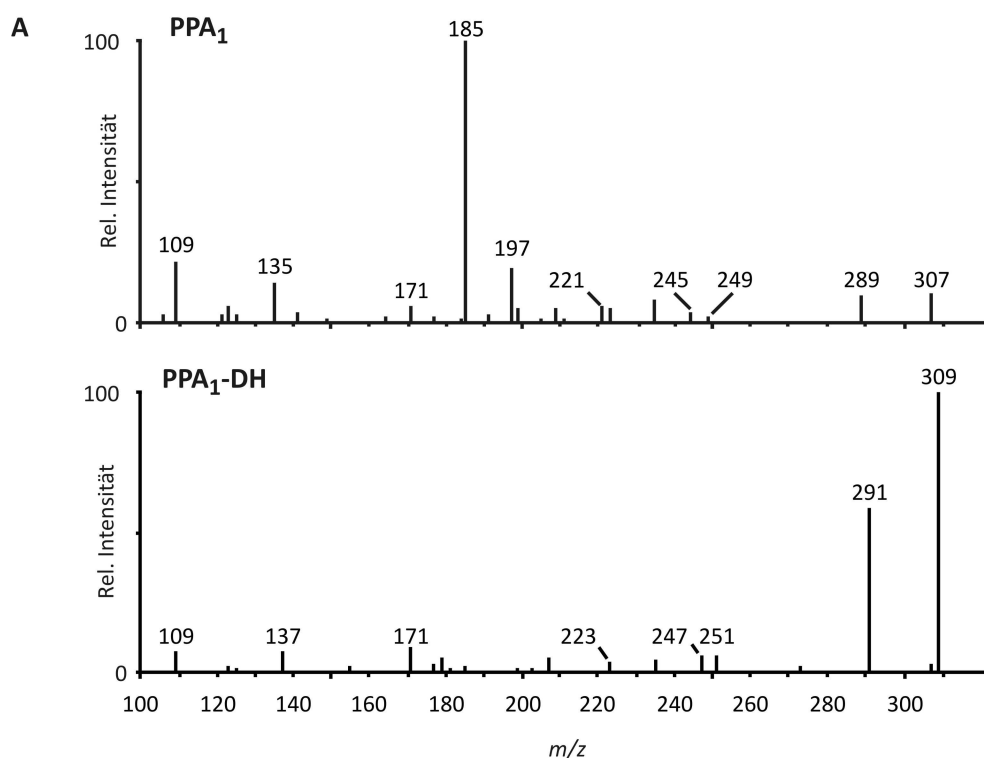


Abbildung III.17 (A): Produktnachweis der mit OPR1 bzw. OPR3 umgesetzten Cyclopentenone PPA₁ (A) und OPDA (B). Fragmentspektrum einer enzymatisch katalysierten Umsetzung von PPA₁ mit OPR1 (A) bzw. OPDA mit OPR3 (B) nach 30 Minuten. Die Identifizierung erfolgte im negativen Elektronenspray Ionisation (ESI) Modus.

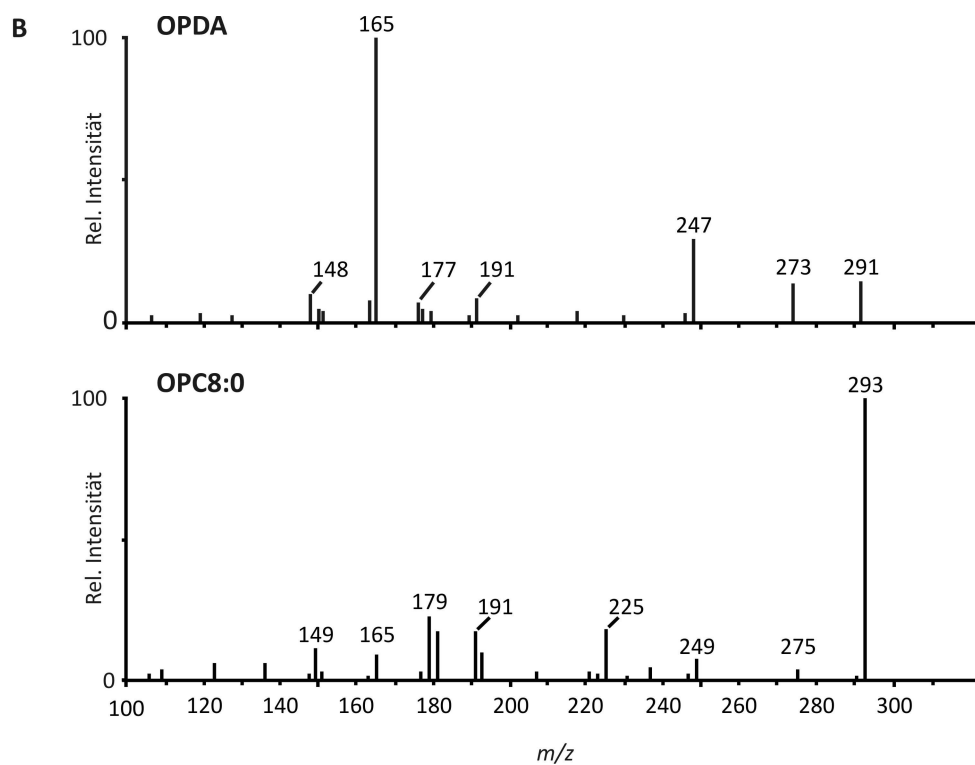


Abbildung III.17 (B): Produktnachweis der mit OPR1 bzw. OPR3 umgesetzten Cyclopentenone PPA₁ (A) und OPDA (B). Fragmentspektrum einer enzymatisch katalysierten Umsetzung von PPA₁ mit OPR1 (A) bzw. OPDA mit OPR3 (B) nach 30 Minuten. Die Identifizierung erfolgte im negativen Elektronenspray Ionisation (ESI) Modus.

III.3.2 Inaktivierung von PPA₁ und OPDA durch Glutathion-S-Transferasen

Eine alternative Möglichkeit zur Entgiftung der reaktiven Cyclopentenonverbindungen PPA₁ und OPDA ist die Kopplung der reaktiven α,β -ungesättigten Carbonylverbindung an Glutathion (DAVOINE *et al.*, 2005). Diese Entgiftungsreaktion wird durch Glutathion-S-Transferasen vermittelt. Die Transkriptomanalyse einer mixotrophen Zellkultur zeigte, dass acht Glutathion-S-Transferasen mehr als dreifach induziert wurden. Von besonderem Interesse war die sowohl durch PPA₁ als auch durch OPDA induzierte GST6 (At2g47730). Die in Proteomanalysen nachgewiesene Lokalisation von GST6 in der Chloroplastenmembran (FRISO *et al.*, 2004) ist mit ihrem hohen Gehalt an α -Linolensäure (18:3) (YAENO *et al.*, 2004) der Ort der Biosynthese von OPDA (DELKER *et al.*, 2006). Für eine Vielzahl von Phytoprostanen wird ebenfalls die Chloroplastenmembran als Syntheseort vermutet. (PARCHMANN and MUELLER, 1998; MUELLER, 2004).

III.3.2.1 Nicht-enzymatische Konjugation von Glutathion an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

Die α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen PPA₁ und OPDA sollten unter basischen Bedingungen fast quantitativ an Glutathion (GSH) binden. Dazu wurde in Analogie zu der Publikation von DAVOINE *et al.*, (2006) je eine der beiden Substanzen (PPA₁ bzw. OPDA [10 μ M]) in einer Lösung von Glutathion (1 mM) in 250 μ l Borsäure/NaOH-Puffer (20 mM, pH 10) gelöst und bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurde ein Reaktionsansatz zur Überprüfung der Verbindungen ohne Glutathion unter den gewählten Bedingungen in 250 μ l Borsäure/NaOH-Puffer (20 mM, pH 10) bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des jeweiligen Ansatzes mittels HPLC-MS/MS analysiert. Nach der einstündigen Inkubation konnte aufgrund der unter basischen Bedingungen nicht-enzymatisch ablaufenden Michael-Addition ein Fragmentspektrum für das PPA₁- bzw. OPDA-Glutathion Konjugat mittels CID aufgenommen werden. Das untersuchte Phytoprostan-Glutathion Konjugat PPA₁-GSH ergab im Chromatogramm ein Peak mit dem Moleküllion ($M+H$) von m/z 616, was der Masse der gesuchten Verbindung entsprach. Die nichtenzymatische OPDA-Kopplung an Glutathion ergab einen Peak mit einem Moleküllion mit der Masse m/z 600. In Abbildung III.18 bzw. Abbildung III.19 sind die erhaltenen Massenspektren von PPA₁-GSH und OPDA-GSH dargestellt. Das als Referenzsubstanz hergestellte PPA₁-GSH Konjugat lieferte neben dem Moleküllion m/z 616 weitere charakteristische Fragmente mit den Massen m/z : 598 (M^+-H_2O), 308 (M^+-PPA_1), m/z : 273 ($M^+-PPA_1-2 H_2O$) und m/z 179 ($M^+-308-129$). Das OPDA-GSH Konjugat (m/z 600) zerfiel charakteristisch in Fragmente mit den Massen m/z 308 (M^+-OPDA) m/z 293 (M^+-308) m/z 275 ($M^+-308-H_2O$) und m/z 179 ($M^+-308-129$). Aufgrund der HPLC-Retentionszeiten und der erhaltenen Massenspektren, insbesondere der charakteristischen Fragmentierungsmustern, konnten beide Verbindungen eindeutig identifiziert werden.

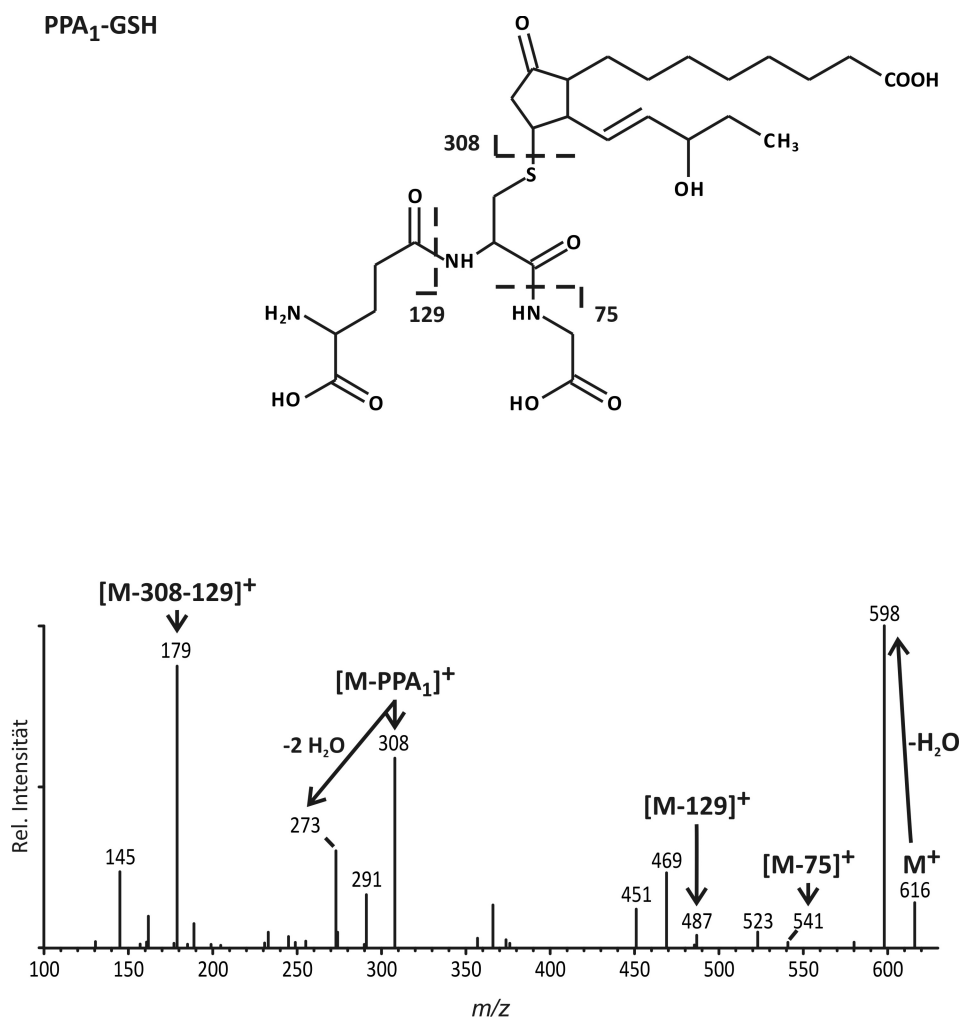


Abbildung III.18: Die Analyse der PPA₁-GSH Addukte (m/z 616) erfolgte mittels HPLC/MS-MS im „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Modus. Die Addukte wurden anhand vier charakteristischer Massenübergänge identifiziert ($616 \rightarrow 598$ [$M^{+H}-H_2O$]; $616 \rightarrow 308$ [$M^{+H}-PPA_1$]; $616 \rightarrow 273$ [$M^{+H}-PPA_1-H_2O$] und $616 \rightarrow 179$ [$M^{+H}-308-129$]). Andere charakteristische Molekülionen hatten die Massen m/z 541 ($M^{+H}-75$) und m/z 487 ($M^{+H}-129$).

OPDA-GSH

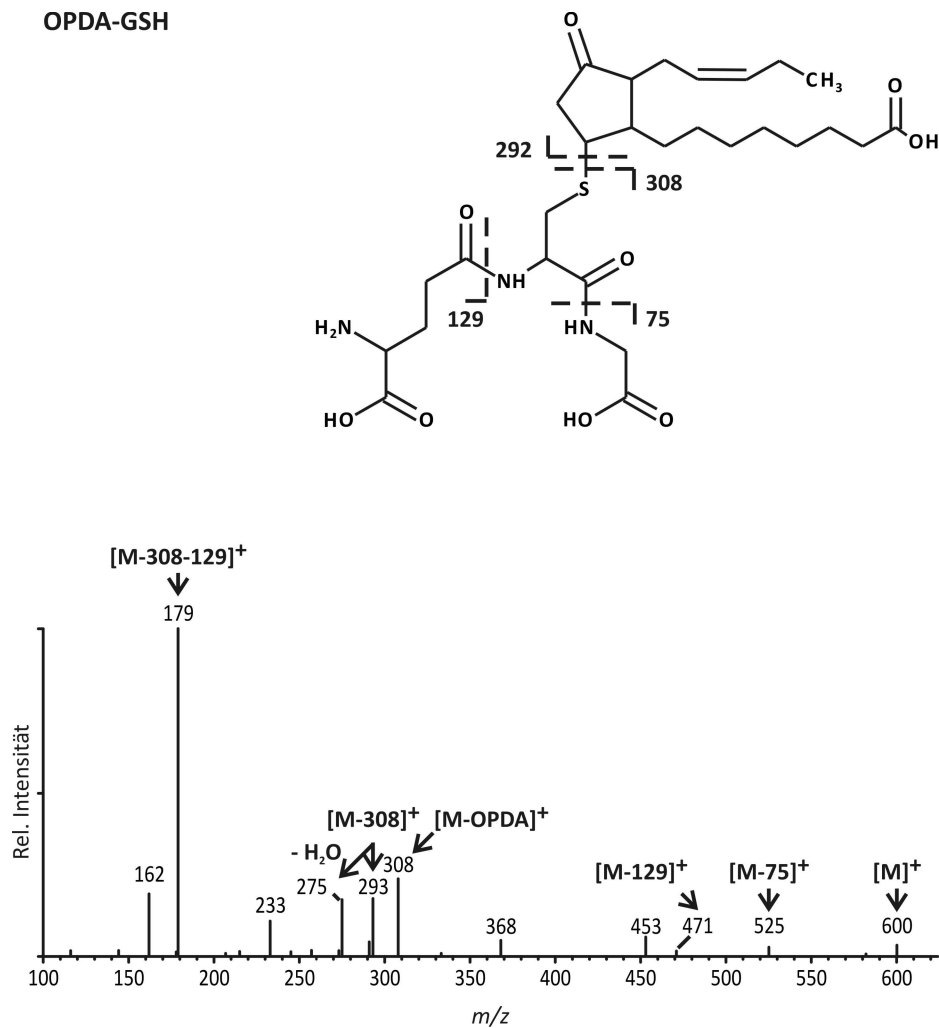


Abbildung III.19: Die Analyse der OPDA-GSH Addukte ($M^{+H}=600$) erfolgte mittels HPLC/MS-MS im „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Modus. Die Addukte wurden anhand vier charakteristischer Massenübergänge identifiziert ($600 \rightarrow 308$ [M^{+H} -OPDA]; $600 \rightarrow 293$ [M^{+H} -308]; $600 \rightarrow 275$ [M^{+H} -308- H_2O] und $600 \rightarrow 179$ [M^{+H} -308-129]). Andere charakteristische Molekülionen hatten die Massen m/z 525 (M^{+H} -75) und m/z 471 (M^{+H} -129).

III.3.2.2 Enzymatische Konjugation von Glutathion an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen

III.3.2.2.1 Reinigungsstrategie

Um in nachfolgenden Experimenten untersuchen zu können, ob die Bildung der Cyclopentenon-Glutathion Addukte enzymatisch oder nicht-enzymatisch katalysiert werden, musste zunächst die GST6 heterolog exprimiert werden. Allerdings konnte zunächst keine ausreichende Anreicherung des rekombinanten GST6-Proteins aus *E.coli* erzielt werden, was mit dem Vorhandensein einer N-terminalen, plastidären Signalsequenz zu tun haben könnte. So ist aus der Literatur bekannt, dass sich Proteine mit einer plastidären Signalsequenz schlecht heterolog exprimieren lassen und die Expression dieser Proteine häufig mit einer Proteininstabilität verknüpft ist (SMITH *et al.*, 2002). Aus diesem Grund musste eine neue Strategie zur Gewinnung von GST6 aus *E.coli* entwickelt werden.

II.3.2.2.2 Klonierung eines neuen GST6 Expressionsvektors

Um eine ausreichende Anreicherung des rekombinanten GST6-Proteins zu erzielen, wurde durch eine zwei Stufen umfassende Klonierungsstrategie das um die Signalsequenz verkürzte *GST6*-Gen mit einem „Hexa-Histidin-tag“ fusioniert. Für die Klonierung des neuen Vektors wurde der Expressionsvektor pET28a (5368 bp) verwendet, da dieser den „Hexa-Histidin-tag“ bereits aufwies. Die *GST6*-cDNA (645 bp) wurde ohne Signalsequenz und ohne Stoppcodon am 3'-Ende mittels PCR amplifiziert und für den späteren Restriktionsverdau mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* versehen und in den Klonierungsvektor pGEMTeasy subkloniert. Auf Grund zweier *XhoI*-Schnittstellen in dem pGEMTeasy:*GST6*-Plasmid musste ein Partialverdau durchgeführt werden. Zuerst wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *NcoI* linearisiert. Das *NcoI*, *XhoI*- Fragment (647 bp) wurde in den linearisierten pET28a-Vektor ligiert. Der neue Expressionsvektor pET28a:*GST6* (5878 bp) zeigte nach einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* die erwarteten Fragmentgrößen (5404 und 474 bp). Daher konnte dieser neuklonierte Expressionsvektor für die Aufreinigung von rekombinanten GST6-Protein in *E.coli* verwendet werden (siehe Anhang, Vektorkarte 1).

III.3.2.2.3 Reinigung von GST6his

Als Reinigungsstrategie für GST6his aus *E.coli* war eine Metall-Affinitätschromatographie vorgesehen. Der Rohextrakt sowie die Elutionsfraktionen wurden im Anschluss daran zur Überprüfung des Reinigerfolges über eine SDS-PAGE (12.5%) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Sowohl im Rohextrakt, als auch in den Elutionsfraktionen konnte eine deutliche Bande dokumentiert werden. Die intensive Bande, die ein Molekulargewicht von ca. 27kDa auf dem Gel aufwies, repräsentierte das gereinigte GST6his-Protein-Monomer. Gereinigtes GST6his stand nun für Analysen zur Aufklärung der enzymatischen Kopplung von Glutathion an die Cyclopentenone PPA₁ und OPDA zur Verfügung

(Abbildung III.20). Zur qualitativen Überprüfung der Reinigung von aktivem Enzym wurde der 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB)-Assay eingesetzt. Dieser Assay wurde zur Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität verwendet. Anhand der spezifischen Aktivität konnten die erhaltenen Proteinfraktionen miteinander verglichen werden. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Proteinfraktionen zur Aufklärung der chemischen Reaktivität der Cyclopentenone PPA₁ und OPDA lag zwischen 53 und 64 nkat/mg Protein.

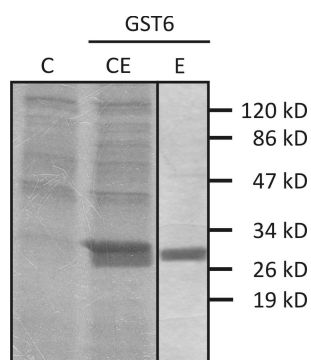


Abbildung III.20: Coomassie-Färbung der SDS-Gelelektrophorese (12.5%) zur Reinigung der Glutathion-S-Transferase GST6his. Die SDS-PAGE zeigt den Proteinrohextrakt (CE) sowie die Elutionsphase (E) der Affinitätschromatographie aus *E.coli*-BL21DE3-Zellen, die das Expressionsplasmid pET28 mit der kodierenden Sequenz für GST6 enthielten. Als Kontrolle wurde der Proteinrohextrakt des *E.coli* BL21DE3-Stammes aufgetragen (C).

III.3.2.3 Untersuchung der enzymatischen Addition von Glutathion an PPA₁ und OPDA

Bei Inkubation von rekombinantem GST6-Protein mit A₁-Phytosteranen und OPDA sollte die Kinetik der enzymatischen Katalyse erfasst werden. Ein kinetisches Experiment besteht darin, unter kontrollierten Bedingungen für Temperatur, Substratkonzentration, Enzymkonzentration und Pufferzusammensetzung die Geschwindigkeit zu messen, mit der das Substrat verschwindet oder das Produkt erscheint. Die einfachste graphische Darstellung der Daten ist eine Zeit-Umsatzkurve, ein Diagramm, in dem die verbleibende Substratmenge gegen die Zeit aufgetragen wird. Die Umsatzgeschwindigkeit k_{obs} ist hierbei sowohl von der Abnahme der Substratmenge als auch der gleichzeitigen Produktzunahme unabhängig. Die Abnahme der Substratkonzentration wurde nachgewiesen, indem die Substrate PPA₁ bzw. OPDA (10 μM) in einem Reaktionsansatz (250 μl) unter Zugabe von Glutathion (1 mM) und rekombinantem GST6 (50 $\mu\text{g/ml}$) in Borsäure/NaOH Puffer (20 mM, pH 7.5) eingesetzt wurden. Der Enzymansatz wurde bei Raumtemperatur bis zu zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde alle drei bis fünf Minuten ein Aliquot (5-10 μl) mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Enzymaktivität wurde aus der Peakfläche der Substrate durch Integration berechnet. Die Umsatzraten der Substrate wurden auf den Ausgangswert (100%) bezogen. Bei dem verwendeten Standardassay konnte ohne Zugabe von rekombinantem GST6-Protein keine Abnahme

des Substrates nachgewiesen werden (Abbildung III.21). Bei Inkubation mit rekombinatem GST6-Protein erhöhte sich die Reaktionsgeschwindigkeit von OPDA ($k_{\text{obs}} = 0.059 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 12.48 \text{ min}$) und PPA_1 ($k_{\text{obs}} = 0.011 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 69.75 \text{ min}$). Dies zeigt, dass PPA_1 und OPDA Substrate für GST6 darstellen. Allerdings ist der Umsatz der Substrate nicht vollständig. Vielmehr ist die Reaktion der Cyclopentenone reversibel. Sowohl Hin- als auch Rückreaktion werden durch das GST6-Protein katalysiert. Im Gleichgewichtszustand liegen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen 39.7 Prozent der PPA_1 - und 25.6 Prozent der OPDA-Moleküle in unkonjugierter Form vor (Abbildung III.21). Zusammenfassend gesagt ist die enzymatisch katalysierte Konjugation von PPA_1 an Glutathion mit einer spezifischen Aktivität von 20 pkat/mg GST6 wesentlich langsamer als die Glutathion-Konjugation von OPDA (110 pkat/mg GST6).

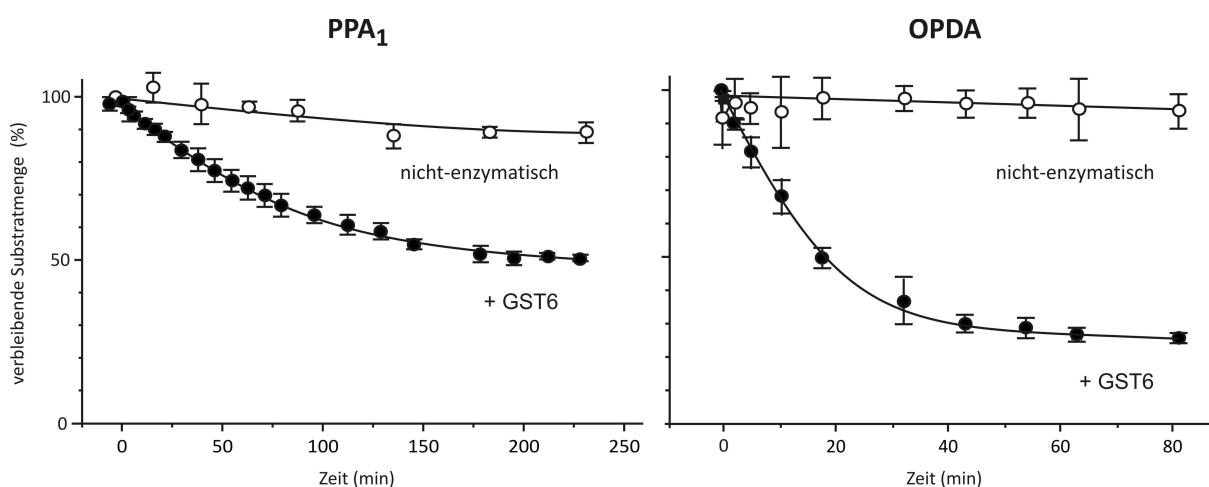


Abbildung III.21: Konjugation der Cyclopentenon-Oxylipine PPA_1 und OPDA an Glutathion. Inkubation des jeweils verwendeten Oxylipin PPA_1 bzw. OPDA (100 μM) mit Glutathion (1 mM) in Abwesenheit (\circ), bzw. Anwesenheit (\bullet) des rekombinanten Proteins GST6 (50 $\mu\text{g/ml}$). Durch die Abnahme der Substratmenge des jeweils eingesetzten Oxylipins konnte der zeitabhängige Verlauf der nicht-enzymatischen (\circ) bzw. enzymatischen (\bullet) GSH-Addition visualisiert werden.

III.3.2.4 *In vivo* Akkumulation der Glutathion-Addukte in *Arabidopsis thaliana*

Mit der oben beschriebenen HPLC-MS/MS-Methode (vgl. III.3.2.1.) konnte pflanzliches Gewebe sowohl auf das Vorkommen von freien A_1 -Phytoprostanen und OPDA, als auch deren mögliche Metabolite untersucht werden. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist eine frühe Reaktion von Pflanzen auf den Kontakt mit nekrotrophen, avirulenten und virulenten Mikroorganismen. Eine besonders dramatische Bildung von ROS wurde bei der Interaktion von *Botrytis cinerea* (THOMA *et al.*, 2003) mit verschiedenen Pflanzen beobachtet. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Oxylipine OPDA und JA in gesunden Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) in deutlich höheren Konzentrationen vorkommen als PPA_1 (THOMA *et al.*, 2003). Nach Infektion von Tomatenblättern mit *Botrytis cinerea* stiegen die Konzentrationen von JA und

Phytoprostan A₁ um das Drei- bis Vierfache an. Somit induziert *Botrytis cinerea* sowohl den Gehalt an Jasmonaten als auch an Phytoprostanen (THOMA *et al.*, 2003). Die Infiltration von avirulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 bewirkte in der Wirtspflanze *Arabidopsis thaliana* ebenfalls einen raschen Anstieg von OPDA (GRUN, 2007). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Gehalt an OPDA in unverwundeten Blättern 0.31 µg/g Trockengewicht beträgt. Die Infiltration von *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana* führte zehn Stunden nach Verwundung zu einem deutlichen Anstieg von OPDA auf 175 ± 7.57 µg/g TG, während in Kontrollpflanzen nur ein kleiner Anstieg von OPDA auf 2.12 ± 0.12 µg/g TG beobachtet wurde. Dagegen war es trotz hochempfindlicher Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) nicht möglich, den Gehalt an PPA₁ quantitativ nachzuweisen. Allerdings konnten die Glutathion-Addukte von PPA₁ und OPDA anhand der charakteristischen Fragmentierungsmuster sowie durch die Retentionszeiten qualitativ eindeutig identifiziert werden (Abbildung III.22). Das relative Verhältnis der integrierten Flächen der Glutathion-Konjugate in unverwundeten Blättern betrug 2.3 zu 1 (OPDA-GSH-Konjugat zu PPA₁-GSH-Konjugat). Nach *Pseudomonas syringae* Infiltration der *Arabidopsis thaliana* Blätter nahm der Gehalt der beiden Glutathion Konjugate dramatisch zu und das Verhältnis der Addukte führte zu einem Verhältnis von 5.6 zu 1. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die *Pseudomonas syringae* Infektion sowohl zu einem Anstieg von OPDA-, als auch von PPA₁-Glutathion-Addukten in *Arabidopsis thaliana* Blättern führt. Eine quantitative Aussage bezüglich des gebildeten Anteils an PPA₁- bzw. OPDA-Glutathion-Addukten war jedoch nicht möglich, da für das jeweilige Glutathion-Konjugat kein isotopenmarkierter (¹⁸O) Standard zur Verfügung stand. In weiteren Versuchen sollte jedoch geklärt werden, warum sich die Anzahl der Peaks zwischen den nichtenzymatisch *in vitro* hergestellten Konjugaten (Abbildung III.22 (D) u. (H)) und des untersuchten Blattmaterials (Abbildung III.22 (B) und (F)) unterscheiden. Während es sich bei dem Oxylin PPA₁ um ein Gemisch von zwei racemischen Regioisomeren und somit um ein Gemisch von insgesamt 12 Stereoisomeren handelt, umfasst die Struktur der synthetischen OPDA vier Stereoisomere. Allerdings können Stereoisomere nur bedingt mit einer HPLC Säule aufgetrennt werden. Die enzymatische Addition von GSH an eines der beiden Oxyline führt zu Oxylin-Addukten, bei denen entweder eine (*R*)- oder (*S*)-Konfiguration vorliegt. Hingegen können bei der nichtenzymatischen Reaktion (*R*)- und (*S*)-Konfigurationen der jeweiligen Oxylin-Addukte vorliegen, was eine Verdopplung der Stereoisomere bedeutet. Dazu wurde das Gemisch aus Typ I und Typ II der A₁-Phytoprostane enzymatisch (100 µM) mit rekombinantem GST6-Protein (200 µg) in 20 mM Borsäure/NaOH-Puffer, pH 7.5 umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Wie Abbildung III.22 (Abbildung III.22 (C) und (G)) zeigt, stimmten die Anzahl der Peaks, das Fragmentierungsmuster und die Retentionszeiten mit den in *Arabidopsis thaliana* gezeigten

PPA₁- und OPDA Glutathion-Konjugaten überein. Somit wird die Bildung der PPA₁-, und OPDA-Glutathion Addukte in *Arabidopsis thaliana* enzymatisch katalysiert.

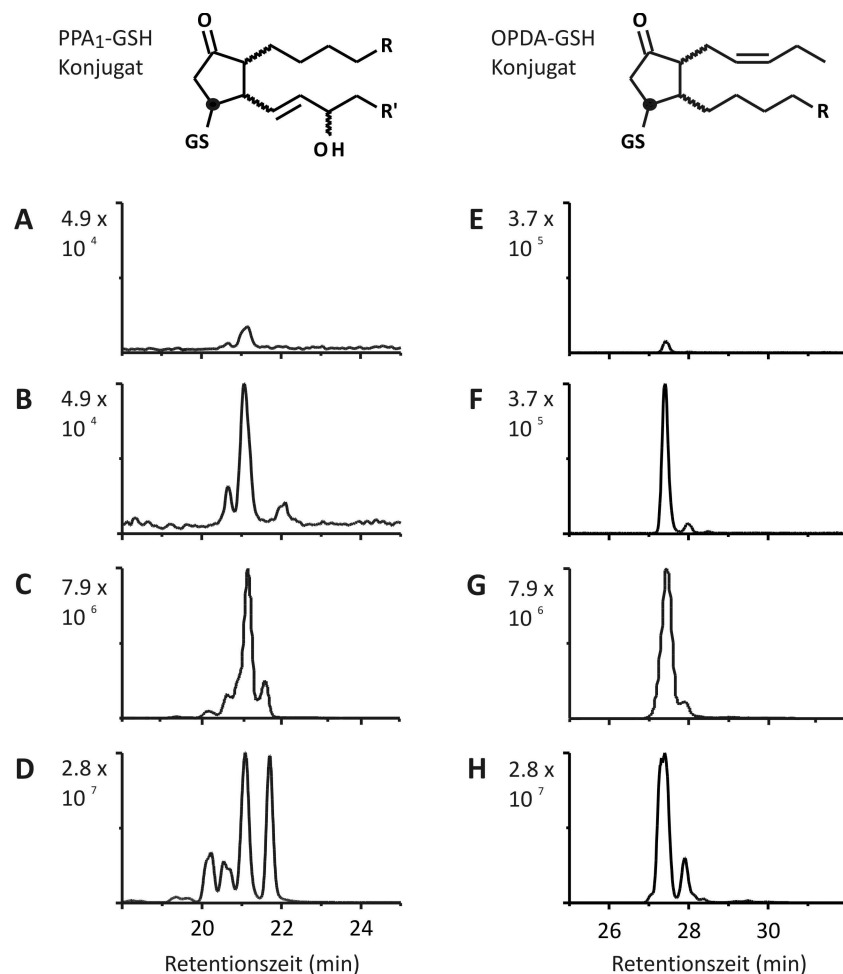


Abbildung III.22: Nachweis der endogen vorkommenden PPA₁-GSH und OPDA-GSH Addukte in *Arabidopsis thaliana* Blättern. Das Vorkommen konnte durch Herstellung *in vitro*-synthetisierter Addukte eindeutig anhand vier charakteristischer MRM-Übergänge identifiziert und qualitativ analysiert werden (PPA₁-GSH: m/z 616→598, 616→308, 616→273, 616→179; OPDA-GSH: m/z 600→308, 600→293, 600→275, 600→179). Die Chromatogramme zeigen den totalen Ionenstrom der vier Übergänge. Die Peaks repräsentieren verschiedene Isomere der Oxylipin-Addukte.

(A) und (E): Relativer Gehalt von PPA₁-GSH (A) und OPDA-GSH (B) in *Arabidopsis thaliana* Blättern, zehn Stunden nach Infiltration der Kontrolllösung MgCl₂.

(B) und (F): Relativer Gehalt von PPA₁-GSH (B) und OPDA-GSH (F) in *Arabidopsis thaliana* Blättern, zehn Stunden nach Infiltration des avirulenten Bakteriumstamms *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

(C) und (G): Peakprofil von PPA₁-GSH (C) und OPDA-GSH (G), welches enzymatisch, bei einem pH von 7.5, mittels rekombinant gereinigtem GST6 Protein *in vitro* hergestellt wurde.

(D) und (H): Peakprofil von PPA₁-GSH (C) und OPDA-GSH (G), welches nicht-enzymatisch bei einem pH von 10 *in vitro* hergestellt wurde.

III.3.3.1 Untersuchung der Lokalisation von GST6

Im Anschluß an die Untersuchung der chemischen Inaktivierung der elektrophilen Substanzen PPA₁ und OPDA durch die elektrophile Addition an Glutathion, sowie dem qualitativen Nachweis in pflanzlichem Gewebe wurde die subzelluläre Lokalisation von GST6 untersucht. Dazu sollten *Arabidopsis thaliana* Protoplasten mit einem GST6: GFP Fusionsprotein transfiziert werden. Bestrahlt man die transformierten Protoplasten mit blauem Licht, so wird das Fusionsprotein durch Fluoreszenz sichtbar. Durch Vergleich des Fluoreszenz-Bildes mit dem Auflichtbild können Rückschlüsse auf die einzelnen Kompartimente und die Lokalisation getroffen werden.

III.3.3.1.1 Klonierung eines GST6 Lokalisationsvektors

Um die Lokalisation von GST6 zu untersuchen, mussten durch eine zwei Stufen umfassende Klonierungsstrategie das *GST6*-Gen mit dem Reportergen *eGFP* fusioniert werden. Dabei wurde das *GST6*-Gen am 3'-Ende mit der Proteinsequenz des „Green Fluorescent Protein“ (eGFP) verbunden. Für die Klonierung des neuen Vektors wurde der Klonierungsvektor pPSI (12544 bp) (BECKER *et al.*, 1992), welcher bereits einen *CaMV-35S* Promotor aufwies, verwendet und mit der *GST6*-Volllänge-cDNA - erweitert um das Reportergen *eGFP* - verwendet. Das 801 bp große *GST6*-Fragment wurde ohne Stoppcodon am 3'-Ende mittels PCR amplifiziert sowie für den späteren Restriktionsverdau mit den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Sma*I versehen. Parallel dazu wurde aus dem Klonierungsvektor pEGFP (4151 bp) das eGFP-Gen (732 bp) mittels PCR reamplifiziert und für den späteren Restriktionsverdau mit den Restriktionsschnittstellen *Sma*I und *Sac*I versehen. Zur weiteren Handhabung sowie zur Sequenzierung wurden die erhaltenen PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pGEMTeasy subkloniert. Für die spätere Ligation mit dem pPSI-Plasmid wurde das *eGFP*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Sac*I aus dem Klonierungsvektor geschnitten. Innerhalb des pPSI-Vektors wurde das Plasmid ebenfalls mit den beiden Restriktionsenzymen ausgeschnitten, so dass das pPSI-Plasmid in linearisierter Form mit kompatiblen Enden vorlag und für die Ligation verwendet werden konnte. Das neue, 13261 bp Plasmid wurde mit dem Namen pPSI-eGFP bezeichnet und seine Identität durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Sma*I und *Sac*I überprüft. Die resultierenden Fragmentgrößen entsprachen dabei den errechneten Werten (12533 bp und 728 bp). Somit stand der Vektor pPSI-eGFP für die weitere Klonierung des *GST6*-Gens zur Verfügung. In der zweiten Klonierungsstufe wurde das *GST6*-Gen mit den Enzymen *Xba*I und *Sma*I aus dem Subklonierungsvektor ausgeschnitten. Parallel dazu wurde das pPSI-eGFP-Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sma*I linearisiert und anschließend mit dem erhaltenen *GST6*-Fragment (801 bp) ligiert. Das neue, zur Lokalisation von GST6 verwendete Plasmid wurde mit dem Namen pPSI-*GST6: eGFP* (14044 bp) bezeichnet und seine Identität durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sac*I überprüft. Die Fragmente zeigten dabei die erwarteten Größen von 12760 bp,

963 bp und 321 bp. Somit war dieses Plasmid zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten einsetzbar (siehe Anhang Vektorkarte 2).

III.3.3.1.2 Subzelluläre Lokalisation der GST6

Die Polyethylenglykol (PEG) vermittelte Transformation stellt eine gute Möglichkeit dar, Gene in Protoplasten transient zu exprimieren. Protoplasten aus dem Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana* wurden - wie im Abschnitt II.8 beschrieben - mit dem pPSI-GST6: EGFP Fusionskonstrukt transformiert. Die subzelluläre Lokalisation der markierten Proteine konnte am darauffolgenden Tag mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) beobachtet werden. Durch Vergleich des Fluoreszenz-Bildes mit dem Lichtbild konnte die GST6 in den Plastiden lokalisiert werden (Abbildung III.23 A und B). Diese Beobachtung wurde in einer unabhängigen Arbeit durch THATCHER *et al.*, (2007) bestätigt. Darüber hinaus konnte THATCHER *et al.*, (2007) zeigen, dass es sich bei GST6 um ein Gen handelt, welches mittels alternativer Transkriptionsstartpunkte für zwei unterschiedliche Proteinformen kodiert. Dabei unterscheiden sich die beiden Formen lediglich am N-terminalen Ende. Die längere Version des Proteins (GST6-L) besitzt ein N-terminales Transitpeptid und ist, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, in den Plastiden lokalisiert. Bei der kürzeren Proteinisoform (GST6-T) konnte eine subzelluläre Lokalisation im Cytosol nachgewiesen werden (THATCHER *et al.*, 2007). In einem weiterführenden Experiment sollte der PPA₁- und OPDA-vermittelte GST6-Expressionslevel den beiden Proteinisoformen zugeordnet werden. Dazu wurde, unter Verwendung spezifischer Primerpaare, die GST6-Expression der beiden kodierenden Proteinisoformen in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung III.23 C zeigen, dass die kürzere Proteinisoform die Mehrheit an den gemessenen GST6-Transkripten repräsentiert. Dies lässt eine GST6-gesteuerte Glutathion-Addition von PPA₁ und OPDA im Cytosol vermuten.

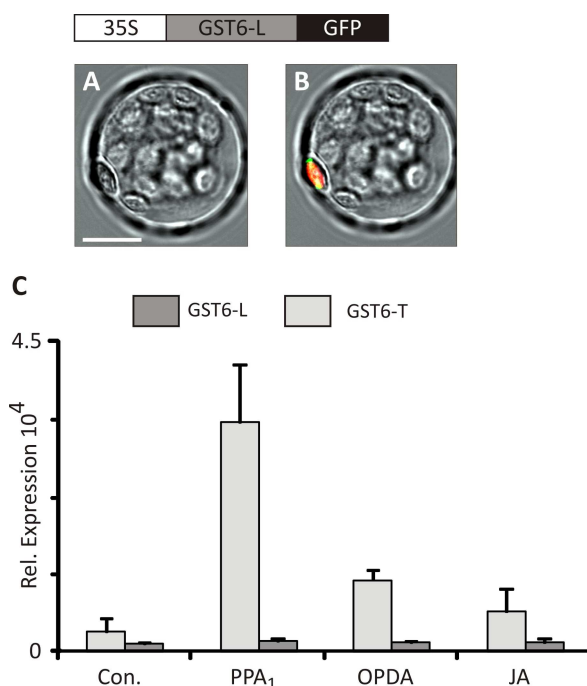


Abbildung III.23: (A) und (B) Untersuchung der subzellulären Lokalisation von GST6 mittels PEG-vermittelter Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten.

(C) Quantitative Real-Time PCR Experimente zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von GST6 in 10 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Dazu wurde der, durch die jeweiligen Oxylipine (PPA₁, OPDA und JA) vermittelte, Expressionsgehalt den beiden GST6-Proteinisoformen (i.e., die lange [GST6-L] bzw. kurze [GST6-T] Proteinisoform von GST6) zugeordnet. Als Kontrollansatz wurden die Pflanzen mit 0.5% MeOH in Wasser (Con.) behandelt. Der Expressionsgehalt wurde gegen die Expression von Actin 2/8 normalisiert (MW \pm SD; n=3).

III.4 Analyse der biologischen Aktivität von Oxylipinen mittels Reportergenlinien

Oxygenierte Fettsäuren werden als erste Antwort auf verschiedene Formen von Stress gebildet und übernehmen sowohl im tierischen als auch pflanzlichen Organismus Signalfunktion (THOMA *et al.*, 2003). Um solche Oxylipine zu identifizieren, wurde häufig zunächst eine chemische Modelloxidation von Fettsäuren *in vitro* durchgeführt (PARCHMANN and MUELLER, 1998). Aus dem komplexen Gemisch an oxygenierten Fettsäuren konnten so Oxylipin-Vertreter, wie zum Beispiel Phytoprostane, Hydroxyfettsäuren und Malondialdehyd auch in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden (PARCHMANN and MUELLER, 1998). An einigen dieser Lipide (Phytoprostane und Malondialdehyd) konnte gezeigt werden, dass sie Abwehr- und Detoxifizierungsgene induzieren, während die biologische Funktion von anderen noch nicht nachgewiesen werden konnte. Die Struktur-Wirkungsbeziehung ist jedoch noch unklar. Von der Arbeitsgruppe Farmer wurde postuliert, dass chemisch reaktive, elektrophile Lipide (RES) ein typisches Genexpressionsprofil in Pflanzen induzieren (ALMERAS *et al.*, 2003). Jedoch konnte in den in vorliegender Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen keine einheitliche, von der Elektrophilie abhängige Geninduktion nachgewiesen werden. Da es folglich bisher nicht bekannt ist, welches Strukturmerkmal für die Induktion von

Detoxifizierungs- und Stressgenen (unter anderem *OPR1* und *GST6*) verantwortlich ist, sollen mit Hilfe von Reportergermlinien systematisch Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden.

III.4.1 *GST6*:LUC-Reportergermlinie

Die Expression von Glutathion-S-Transferasen wird durch eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressfaktoren induziert (MOONS, 2005). Nach Behandlung einer mixotrophen Zellkultur durch die Phytoprostane- A_1 wurden acht Glutathion-S-Transferasen mehr als dreifach induziert. Unter diesen Glutathion-S-Transferasen befindet sich auch die *GST6*. In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Singh konnte ebenfalls eine Salicylsäure- und Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-vermittelte *GST6*-Expression gezeigt werden (CHEN *et al.*, 1996). Zusätzlich wurde von dieser Arbeitsgruppe eine Reportergermlinie (*gst6: LUC*) mit dem *GST6*-Promotorbereich hergestellt, die zur Untersuchung der Expressionsregulationsaktivität von Substanzen wie zum Beispiel Salizylsäure und H_2O_2 diente (CHEN and SINGH, 1999). Die *GST6* ist besonders interessant, da der Promotor ein Erkennungsmotiv für TGA-Transkriptionsfaktoren enthält, die *GST6*-Expression durch oxidierte Lipide unterschiedlicher Elektrophilie induziert wird und das Genprodukt die Metabolisierung von Phytoprostan A_1 und OPDA katalysiert.

III.4.2 Biologische Aktivität der Oxylipine PPA_1 und OPDA

Bevor eine Untersuchung der Expressionsregulationsaktivität verschiedener enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine durchgeführt werden konnte, musste das Testsystem gegen eine Bezugsverbindung normiert werden. Als Bezugskonstante erwies sich Prostaglandin A_1 (Phytoprostane A_1 und OPDA-Analogon) aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit als besonders geeignet. Die Behandlung der *gst6: LUC* Pflanzen mit PGA_1 (75 μM) im Standardassay (Material und Methoden II.11) zeigt über einen Zeitraum von 14 Stunden einen Lumineszenz-Verlauf, der sich in drei Phasen unterteilen lässt. Einem linearen Anstieg folgt zwischen der vierten und siebten Stunde nach Behandlung eine Plateauphase, bevor ab der zehnten Stunde die Luziferaseaktivität abnimmt. Somit wurde die Expressionsaktivität sieben Stunden nach Zugabe der unterschiedlich getesteten Substanzen in Relation zu PGA_1 gesetzt (Abbildung III.24 A). In weiteren Studien zur Untersuchung der Expressionsregulationsaktivität des *GST6*-Promotors sollte zunächst der Einfluss der Cyclopentenon-Oxylipine Phytoprostan A_1 (PPA_1), 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) und des Cyclopentanons Jasmonsäure getestet werden. Wie Abbildung III.24 B zeigt, bewirken lediglich OPDA (28%) und PPA_1 (14%) einen Anstieg der Lumineszenz. Dies stimmt sowohl mit den durchgeführten Expressionsanalysen als auch mit der Hypothese überein, dass die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des Cyclopentanringes einen entscheidenden Einfluss auf die Expressionsaktivität besitzt.

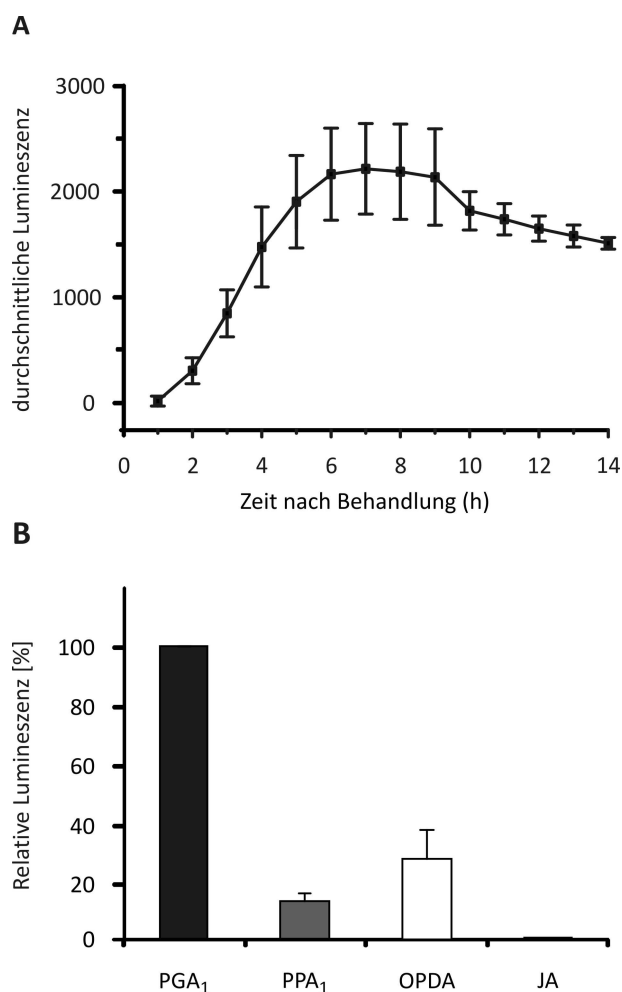


Abbildung III.24: (A) Normierung des Testsystems erfolgte durch die Behandlung der *Arabidopsis thaliana* *gst6: LUC* Pflanzen mit 75 µM PGA₁. Als Kontrollansatz wurden die Pflanzen mit 2% MeOH (in H₂O) behandelt. Die *GST6*-Expressionsaktivität wurde durch die relative Lumineszenz mittels einer CCD-Kamera erfasst. Die erhaltene, dargestellte durchschnittliche Lumineszenz entspricht den Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung abzüglich der Kontrollmessungen.

(B) Untersuchung der *GST6*-Expressionsaktivität durch die Behandlung der *Arabidopsis thaliana* *gst6: LUC* Pflanzen durch verschiedene Oxylipine. Dabei wurden die Pflanzen mit den jeweiligen Oxylipinen (75 µM) behandelt und die jeweiligen Lumineszenzwerte mittels einer CCD-Kamera über einen Zeitraum von 14 Stunden verfolgt. Parallel dazu wurden die Pflanzen in einem Kontrollansatz mit 2% MeOH (in H₂O) behandelt. Die erhaltenen relativen Lumineszenzwerte wurden sieben Stunden nach Behandlung miteinander verrechnet und gegen die PGA₁-vermittelte normalisiert.

III.4.3 Biologische Aktivität der reduzierten Verbindungen

Die *gst6: LUC* Reporterogenlinie wurde verwendet, um den Einfluss der Struktur-Wirkungsbeziehung reaktiver, elektrophiler Cyclopentenone (PPA₁ bzw. OPDA) und ihrer durch Oxidoreduktasen reduzierten Form (PPA₁-DH bzw. OPC:8) anhand der Expressionsaktivitäten des *GST6* Promotors zu untersuchen. Dazu wurden die Cyclopentenone PPA₁ und OPDA (100 µM) in Gegenwart von 10 µg

der rekombinanten Oxidoreduktasen OPR1 und OPR3 in 1 ml einer NADPH-Lösung (120 μ M) in MS-Medium gelöst und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz zur Überprüfung der Stabilität der Verbindung unter den gewählten Bedingungen in 1 ml MS Medium ohne rekombinantes Protein inkubiert. Nach 25 Minuten wurde der Reaktionsansatz durch Hitze-Inaktivierung des Proteins (95°C für 10 min) abgestoppt. Anschließend wurde das Anzuchtmedium (MS-Medium) der *Arabidopsis thaliana* *gst6::LUC*-Pflanzen gegen die verschiedenen Reaktionsansätze ausgetauscht und die Expressionsaktivität des *GST6*-Promotors mittels CCD-Kamera über einen Zeitraum von 14 Stunden aufgezeichnet. Nach 25 minütiger Inkubation mit den Oxidoreduktasen OPR1 und OPR3 konnten im Vergleich zum Kontrollansatz nur noch 25 bzw. 17% der Expressionsaktivität nachgewiesen werden. Damit war die Aktivierung des *GST6*-Promotors durch die enzymatisch reduzierten Verbindungen im Vergleich zu PPA₁ bzw. OPDA deutlich herabgesetzt (Abbildung III.25).

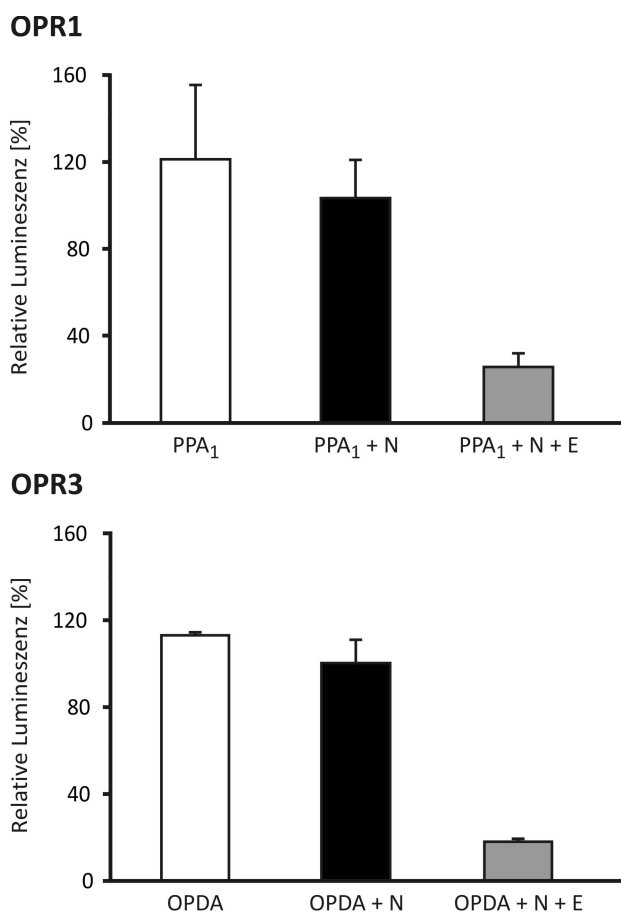


Abbildung III.25: Untersuchung der biologischen Aktivität von PPA₁ bzw. OPDA nach Reduktion mittels Oxidoreduktasen. Die Inkubation der Cyclopentenon-Oxylipine PPA₁ bzw. OPDA erfolgte mit dem jeweiligen rekombinanten OPR1 bzw. OPR3 Enzym (E) in Gegenwart von 120 μ M NADPH (N) bei Raumtemperatur im MS-Medium. Als Kontrollansätze dienten Versuchsansätze mit den jeweiligen Substraten oder die Substrate in Gegenwart von NADPH (N) im MS-Medium. Aussagen zur biologischen Aktivität konnten mittels der *GST6* Promotoraktivität durch die *Arabidopsis thaliana* *gst6::LUC*-Pflanzen getroffen werden.

III.4.4 Herstellung von GATEWAY-Konstrukten zur Generierung weiterer Reportergermlinien

Nach der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Oxylipine auf die Expressionsaktivität des *GST6*-Promotors sollten durch die Herstellung weiterer Reportergermlinien Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehung gewonnen werden. Dazu wurden die Promotoren der Oxidoreduktasen *OPR1* und *OPR3* ausgewählt, die eine unterschiedliche Regulation durch verschiedene Oxylipine aufweisen. So kodieren *OPR1* und *OPR3* NADPH-abhängige Reduktasen, die chemisch reaktive α,β -ungesättigte Ketone reduzieren können. Bezüglich ihrer Regulation und Substratspezifität unterscheiden sie sich aber. *OPR3* ist eine OPDA-Reduktase, die durch Jasmonat, jedoch nicht durch Phytoprostan A_1 , induziert wird und an der Jasmonsäurebiosynthese beiteiligt ist. *OPR1* ist dagegen eine Reduktase, die durch oxidativen Stress, Pathogene und oxidierte Lipide (darunter PPA₁, Malondialdehyd und OPDA) induziert werden und Ketone reduzieren können.

III.4.4.1 Klonierungsstrategie zur Gateway-Klonierung

Um die Promotoraktivität der ausgewählten Reduktasen *OPR1* und *OPR3* zu untersuchen, musste durch eine zwei Stufen umfassende Klonierungsstrategie der jeweilige Promotorbereich in den „destination“-Vektor pMDC: *LUC* (12895 bp) übertragen werden. Das 2092 bp große *OPR1* beziehungsweise 2311 bp große *OPR3*-Promotorfragment wurde ohne Startcodon mittels PCR amplifiziert sowie für den späteren Restriktionsverdau mit den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I versehen. Zur weiteren Handhabung und zur Sequenzierung wurden die erhaltenen PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pGEMTeasy subkloniert. Für die spätere Ligation mit dem „entry“-Vektor pENTR-MCS (2785 bp) wurde das *OPR1*-, *OPR3*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten. Innerhalb des pENTR-Vektors wurde das Plasmid ebenfalls mit den beiden Restriktionsenzymen ausgeschnitten, so dass das pENTR-Plasmid in linearisierter Form mit kompatiblen Enden vorlag und für die Ligation verwendet werden konnte. Die neuen, 4793 bp beziehungsweise 5012 bp großen, Plasmide wurde mit dem Namen pENTR-*OPR1* und pENTR-*OPR3* bezeichnet. Ihre Identität wurde sowohl durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I als auch durch Sequenzierung überprüft. Für die anschließende Gateway-Klonierungs-Reaktion wurden die Promotorfragmente von *OPR1* und *OPR3* zwischen den beiden Rekombinationsstellen, attL1 und attL2, platziert. Somit konnten die Promotorfragmente in einer LR-Clonase-Reaktion aus dem „entry“-Klon in den „destination“-Vektor pMDC: *LUC* mittels homologer Rekombination transferiert werden. Nach Überprüfung der Identität der hergestellten Gateway-Konstrukte mittels Restriktionsverdau mit den beiden Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Xba*I standen die Plasmide für Herstellung weiterer Reportergermlinien in *Arabidopsis thaliana* bereit (siehe Anhang Vektorkarte 3 und 4).

IV. Diskussion

IV.1 Biologische Aktivität von Jasmonaten und Phytoprostanen

Jasmonate und Phytoprostane gehören zur Klasse der Oxylipine, die alle oxygenierte Fettsäuren umfasst. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten werden Jasmonate und Phytoprostane auf völlig unterschiedlichem Wege gebildet. Die Biosynthese der Jasmonate verläuft enzymatisch, während Phytoprostane radikalisch durch Oxidation der α -Linolensäure gebildet werden. Das sich partiell überlappende Wirkspektrum von Jasmonaten und Phytoprostanen spiegelt jedoch die auffallende Strukturähnlichkeit wider. Allerdings konnte bisher keine allgemein gültige Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Die Leitsubstanzen der Jasmonate, JA und ihr biosynthetischer Vorläufer OPDA, sind etablierte Signalstoffe, für die eine ganze Reihe von Effekten bekannt sind. Darunter zählen wichtige Funktionen in der pflanzlichen Abwehr, der Fortpflanzung und Entwicklung von Pflanzenorganen (LIECHTI and FARMER, 2002) sowie die Induktion der *de novo*-Synthese von antimikrobiell wirkenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Phytoalexinen) (MUELLER *et al.*, 1993; PARCHMANN *et al.*, 1997). Solche Phytoalexine können keiner einheitlichen Stoffklasse zugeordnet werden und werden von verschiedenen Mitgliedern der Jasmonate in unterschiedlichem Maße induziert. Auch PPA₁ und PPB₁, zwei charakteristische Vertreter der Phytoprostane, induzieren die Synthese von Phytoalexinen. Sanguinarin, Chelirubin und, wenn auch in geringerem Maß, Macarpin seien als Stellvertreter für die sowohl durch Jasmonate als auch durch Phytoprostane induzierten Phytoalexine genannt (THOMA *et al.*, 2003).

Weitaus länger bekannt ist der hemmende Effekt von JA und seinem Methylester MeJA auf das Wurzelwachstum (DATHE, 1981). Studien mit OPDA und PPA₁ zu dieser klassischen JA-Wirkung zeigten, dass auch diese oxygenierten Fettsäuren einen hemmenden Effekt auf das Wurzelwachstum ausüben. Weitere Untersuchungen ergaben, dass sowohl JA als auch PPA₁ und OPDA diese Wirkung über das Signalprotein COI1 vermitteln (Abbildung III.7). Neben diesen Arbeiten am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie konnte die Hemmung des Wurzelwachstums durch verschiedene Oxylipin-Klassen bereits 2007 durch VELLOSILO *et al.*, (2007) gezeigt werden. Im Vordergrund dieser Arbeit stand jedoch der Zusammenhang zwischen der Oxylipinstruktur und der vermittelten Wirkung. Tatsächlich lassen sich drei phänotypisch charakteristische Erscheinungsformen der Wurzelwachstumshemmung unterschiedlichen Oxylipinklassen zuordnen. Ein induziertes wellenförmiges Wachstum mit Wachstumshemmung der lateralen Wurzeln wird durch nicht-zyklische Oxylipine mit Hydroxy- oder Ketogruppen vermittelt. Nicht-zyklische Oxylipine mit dem Strukturelement eines Divinylethers vermitteln einen Phänotyp mit verkürzten, aber vermehrten

Lateral- und Adventivwurzeln. Zyklische Oxylipine schließlich, darunter JA und OPDA, führen zu einer generellen Wurzelwachstumshemmung (VELLOSILLO *et al.*, 2007).

Neben diesen Wirkungen von Jasmonaten und Phytoprostanen in *Arabidopsis thaliana* war für JA ein negativer Einfluss auf die Zellteilung im Modell der BY-2 Zellen bekannt (SWIATEK *et al.*, 2002; SWIATEK *et al.*, 2004; PAUWELS *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser hemmende Effekt in BY-2 Zellen auch für PPA₁ und OPDA gezeigt werden (Abbildung III.4).

IV.2 Phytoprostan-vermittelte Genexpression

Während die beiden Jasmonate JA und OPDA bei der Hemmung des Wurzelwachstums gleiche Effekte ausüben, scheint es aber auch JA- bzw. OPDA-spezifische Reaktionen zu geben. Mit der Identifizierung der *Arabidopsis thaliana opr3* Mutante, die in der Umsetzung von OPDA zu JA inhibiert ist, konnte eine unterschiedliche Wirkungsweise von OPDA bzw. JA bei der Blütenentwicklung nachgewiesen werden. Der Verlust der Fertilität der *opr3*-Mutante konnte durch Zugabe von JA aufgehoben werden (STINTZI and BROWSE, 2000). Des Weiteren zeigten *opr3* knockout Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Befall der Larven der Mücke *Bradysia impatiens* und dem Pilz *Alternaria brassicola* (STINTZI *et al.*, 2001). Da die *opr3*-Mutante lediglich in der Synthese von JA, nicht aber in der von OPDA defizient ist, tritt OPDA als ein von JA unabhängiges Signalmolekül in Erscheinung. Unterschiede in den Genexpressionsprofilen, vermittelt durch OPDA bzw. JA in der *Arabidopsis thaliana opr3*-Mutante, bestätigen OPDA als unabhängiges Signalmolekül (STINTZI *et al.*, 2001; TAKI *et al.*, 2005). Während JA überwiegend Gene induziert, die der JA-Biosynthese und dem Ascorbat sowie Glutathionmetabolismus zugeordnet sind, induziert OPDA Gene, die Proteine aus der Detoxifizierungs- und Stressantwort kodieren (TAKI *et al.*, 2005). Northern Blot Analysen der OPDA-spezifischen Gene *ZAT10*, *FAD-OXR*, *AtERF5*, *DREB2A*, *GST6* und *TCH4* zeigten eine COI1-unabhängige Signalweiterleitung (TAKI *et al.*, 2005), wohingegen JA seine Signalweiterleitung über das Signalprotein COI1 vermittelt (SCHILLMILLER and HOWE, 2005). Dieser Unterschied in der Signalwirkung könnte sich mit dem Vorhandensein einer α,β ungesättigten Carbonylstruktur erklären lassen (STINTZI *et al.*, 2001). Untersuchungen in der *Arabidopsis thaliana aos*-Mutante belegen, dass neben OPDA und JA noch weitere Strukturanaloga an der Genexpression beteiligt sein müssen (TAKI *et al.*, 2005). Da in der *Arabidopsis thaliana aos*-Mutante die JA-Biosynthese blockiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Substanzen handeln muss, die bei der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation gebildet werden (VOLLENWEIDER *et al.*, 2000; THOMA *et al.*, 2003). Zu diesen Verbindungen zählen unter anderem Malondialdehyd und PPA₁, für deren Bildung freie Radikale benötigt werden.

Aufgrund der Toxizität von freien Radikalen besitzen Zellen eine Reihe von Entgiftungssystemen für Radikale. Als wichtigster Membran-ständiger Radikalfänger gilt Tocopherol. *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit einem Defekt in der Tocopherol-Biosynthese (*vte*, Vitamin E) zeigen einen erhöhten Gehalt an Phytoprostanen und Malondialdehyd (SATTLER *et al.*, 2006). Die Spiegel an Phytoprostanen sind im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen in drei Tage alten *vte2*-Keimlingen um mehr als den Faktor 100 erhöht (SATTLER *et al.*, 2006). Auch Malondialdehyd ist in den drei Tage alten *vte2*-Keimlingen mit einer vierfachen Erhöhung gegenüber den Wildtyp-Pflanzen deutlich gesteigert (SATTLER *et al.*, 2006). Es ist bemerkenswert, dass die Phytoprostan- und Maldondialdehydspiegel in *vte2*-Pflanzen, die älter als sechs Tage waren, wieder auf das Niveau der Wildtyppflanzen sanken und diese Spiegel während des weiteren Lebenszyklus' niedrig blieben (SATTLER *et al.*, 2006). Diese rasche Abnahme an nicht-enzymatischen Oxylipinen in *Arabidopsis thaliana vte2*-Keimlingen legt die Vermutung nahe, dass ein Tocopherol-unabhängiger Kontrollmechanismus den Gehalt an Phytoprostanen und Malondialdehyd reguliert (SATTLER *et al.*, 2006).

Für reaktive elektrophile Substanzen (RES), zu denen Cyclopentenon-Phytoprostane und Malondialdehyd zählen, konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die α,β -ungesättigte Carbonylstruktur ein essentielles Strukturelement bei der durch die beiden Substanzen-vermittelten Genexpression darstellt. So führen α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen in *Arabidopsis thaliana* zu einer Induktion der *Glutathion-S-Transferase1* (*GST1*) (VOLLENWEIDER *et al.*, 2000; LOEFFLER *et al.*, 2005) und *OPR1* (ALMERAS *et al.*, 2003). Ebenso induziert OPDA die Expression von *GST1* und *OPR1* in *Arabidopsis thaliana*, nicht jedoch JA (STINTZI *et al.*, 2001). Daher scheint die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung für eine Induktion dieser beiden Markergene wichtig zu sein (VOLLENWEIDER *et al.*, 2000).

Zur Aufklärung der biologischen Aktivität von Phytoprostanen nutzten frühere Arbeiten am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie c`DNA Microarrays mit Stress-responsiven Genen. Dazu wurde eine *Arabidopsis thaliana* Zellkultur mit zwei verschiedenen Regioisomeren von B₁-Phytoprostanen behandelt und die Genregulation unter der Verwendung eines c`DNA Microarrays mit Stress-responsiven Genen untersucht (LOEFFLER *et al.*, 2005). Neben Stress- und Detoxifizierungsgenen der Phase I und II wurden die an der Biosynthese von Camalexin beteiligten Gene induziert (LOEFFLER *et al.*, 2005). Insbesondere die Induktion von Genen der Phase I und II, Glutathion-S-Transferasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und Oxidoreduktasen, wurde ebenfalls in Transkriptomanalysen in drei Tage alten *Arabidopsis thaliana vte2*-Keimlingen gegenüber Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen (SATTLER *et al.*, 2006). Der Großteil dieser 160 spezifisch induzierten Gene wurde ebenfalls durch biotische Stressfaktoren wie die Pathogene *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea* und *Alternaria brassicola* induziert, jedoch nicht durch abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Verwundung, Hitze- oder Kältestress (SATTLER *et al.*, 2006). Weiterhin wurde ein Großteil der 160 induzierten Gene

in den *vte2*-Keimlingen durch reaktive Sauerstoffspezies wie Ozon und Silbernitrat, jedoch nicht durch Methyljasmonat, induziert, was auf eine bedeutende Rolle der nicht-enzymatischen Lipidperoxidationsprodukten in der Genexpression und zellulären Antworten von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen hindeutet.

Zur weiteren Aufklärung der genregulatorischen Aktivität von Phytoprostanen wurden in nachfolgenden Microarrays das Phytoprostan A₁-vermittelte Genexpressionsprofil untersucht. PPA₁-behandelte *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen sowie zehn Tage alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden mittels eines Microarrays analysiert und ihre Genexpressionsprofile mit denen von OPDA und bzw. JA-behandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verglichen. Die funktionelle Klassifizierung der mehr als dreifach induzierten Gene ergab, dass vorrangig Detoxifizierungs- (Cytochrom P450-Monooxygenase, Glutathion-S-Transferase, UDP-Glycosyltransferase, Oxidoreduktase) und Stressgene wie z.B. HSP17.6 hochreguliert wurden (Abbildung III.1). Anschließend *in silico*-Analysen mit „Genevestigator“ (<http://www.genevestigator.ethz.ch>) zeigten, dass 42 Prozent der PPA₁-induzierten Gene auch durch OPDA induziert wurden. Dagegen wurden nur drei Prozent der PPA₁-induzierten Gene auch durch JA induziert. Diese Ergebnisse unterstützen die Struktur-Hypothese, nach der die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung an der Induktion von Detoxifikation- und Stressgenen beteiligt sind (ALMERAS *et al.*, 2003; TAKI *et al.*, 2005).

Eine weitere Struktur-Hypothese der Arbeitsgruppe Farmer postuliert, dass alle chemisch reaktiven elektrophilen Lipide ein typisches Genexpressionsprofil in Pflanzen induzieren (ALMERAS *et al.*, 2003). Daher wurde die Induktion von 13 ausgewählten PPA₁-induzierten Detoxifizierungs- und Stressgenen nach Behandlung mit PPB₁, dPPJ₁, OPDA und JA verglichen. Nach dem von der Arbeitsgruppe Farmer beschriebenen Konzept der Elektrophilie sollten die Oxylipine PPA₁, dPPJ₁ und OPDA ein einheitliches Genexpressionsprofil induzieren. Entsprechend sollten die schwächeren elektrophilen Verbindungen PPB₁ und JA ein anderes Genexpressionsprofil induzieren. Wie Abbildung III.2 jedoch zeigt, kann diesen beiden Gruppen kein, entsprechend ihrer Elektrophilie, einheitliches Genexpressionsprofil zugeordnet werden. Vielmehr scheinen die regulatorischen Effekte der einzelnen Oxylipine partiell zu überlappen, so dass jedes Oxylin ein eigenes Expressionsmuster der getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene hervorruft. Somit können die beobachteten Expressionsmuster nicht allein mit dem elektrophilen Charakter der untersuchten Oxylipine erklärt werden. Die genregulatorischen Eigenschaften des Cyclopentanons JA und der Cyclopentenone PPA₁ bzw. OPDA können dementsprechend nicht alleine durch die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung erklärt werden.

Die Arbeiten von TAKI *et al.*, (2005) zeigten, dass neben der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung auch die Länge der Carboxyl-Seitenkette zu den genregulatorischen Eigenschaften des Cyclopentenons OPDA beiträgt. Northern Blot Analysen von OPDA, den JA-Biosynthese Intermediaten OPC8:0 (3-Oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octadecanoic acid), OPC6:0 (3-Oxo-2-

(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-hexanoic acid) bzw. JA behandelten zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zeigten deutliche Unterschiede in der Geninduktion der OPDA Markergene *ZAT10*, *FAD-OXR*, *AtERF DREB2A*. Dabei zeigte sich, dass OPC8:0 bzw. OPC6:0, die eine acht bzw. sechs Kohlenstoffatome lange Carboxyl-Seitenkette besitzen, ein zu OPDA vergleichbares Genexpressionsprofil aufweisen. Dagegen vermittelte JA mit einer um weitere zwei Kohlenstoffatome kürzeren Carboxyl-Seitenkette die Induktion keines der getesteten OPDA Markergene (TAKI *et al.*, 2005). Somit scheint folglich die Länge der Carboxyl-Seitenkette, neben der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung, einen Einfluss auf die genregulatorischen Eigenschaften der einzelnen Oxylipine auszuüben.

IV.3 Phytoprostan induzierte Signaltransduktion

Die Prozesse der Signalweiterleitung, durch die OPDA bzw. PPA₁ ihre genregulatorischen Effekte vermitteln, sind im Gegensatz zu JA weitgehend unbekannt. Das wichtigste an der JA-vermittelten Signalwirkung beteiligte Element ist COI1. COI1 ist ein Protein, das Leucin-reiche-Wiederholungen und ein F-Box-Motif enthält (XIE *et al.*, 1998). F-Box Proteine sind am Ubiquitin-abhängigen Abbau von Proteinen beteiligt. Die Arbeiten von (XU *et al.*, 2002) zeigten, dass COI1 mit anderen Proteinen assembliert, um einen an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligten Ubiquitin-Ligase-Komplex zu bilden (XU *et al.*, 2002). Seine Funktion in der JA-Signalweiterleitung übt COI1 durch die Regulation des Abbaus negativer Regulatoren aus. Diese negativen Regulatorelemente konnten kürzlich mit den JAZ-Proteinen identifiziert werden (THINES *et al.*, 2007). Dabei stellt das JAZ Protein JAI3 ein Target für den COI1-abhängigen Abbau dar, welcher damit die Aktivität des nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktors JIN1 steuert (THINES *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob der an der JA-Signaltransduktionskaskade beteiligte Faktor COI1 bzw. JIN1 ebenfalls bei der PPA₁- und OPDA-vermittelten Genexpression ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene eine wichtige Rolle spielt, wurde mittels quantitativer Real-Time PCR der relative Expressionsgehalt ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene nach Behandlung durch PPA₁ bestimmt (Abbildung III.8). In den mit PPA₁-behandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen konnte jedoch in der Genexpression der getesteten Gene in der *Arabidopsis thaliana coi1*- bzw. *jin1*-Mutante kein Unterschied im Vergleich zur Wildtypfpflanze festgestellt werden. Demnach ist die PPA₁-vermittelte Geninduktion der getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene nicht über die Signalproteine COI1 und JIN1 vermittelt. Folglich ist es vorstellbar, dass die PPA₁-vermittelte Genexpression über einen alternativen Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Ausgehend von den Genexpressionsdaten wurden in einem weiteren Experiment die Promotorbereiche der mehr als dreifach durch PPA₁-induzierten Gene auf häufig vorhandene Sequenzmotive mit Hilfe des „Motif Analysis Tools“ der *Arabidopsis thaliana* Internetseite (TAIR)

analysiert. Über 50 Prozent der Promotoren enthalten in den ersten 500 Basenpaaren ein Bindungsmotiv für Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie. TGA-Transkriptionsfaktoren binden an *as-1* (*activating sequence 1*)-ähnliche Sequenzmotive in Promotoren von Genen, welche durch unterschiedliche Stimuli (u.a. Pathogene und Salizylsäure) aktiviert werden können. Ferner ist bekannt, dass die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 mit NPR1, einem zentralen Regulator von Salizylsäure-gesteuerten Reaktionen, interagieren. Die Induktion der PR-Genexpression sowie der Pathogenresistenz durch Salizylsäure (SA)-Analoga ist in der *npr1*-Mutante gestört, was auf eine wichtige Rolle dieser Proteine in der Vermittlung von Stressantworten hindeutet (ZHANG *et al.*, 2003). Um festzustellen, ob TGA-Transkriptionsfaktoren die Phytoprostan-vermittelte Genexpression vermitteln, wurde die Expression von Phytoprostan-responsiven Genen in der *Arabidopsis thaliana tga2tga5tga6*-Mutante untersucht, die Defekte in der Bildung der TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 aufweist. Die Induktion der Gene *GST6*, *ToIB*, *OPR1* und *CYP81D11* durch PPA₁ und OPDA ist in der TGA-Dreifach Mutante dramatisch verringert (Abbildung III.9 und Abbildung III.10). Dies deutet darauf hin, dass TGA-Transkriptionsfaktoren nicht nur an der SA-vermittelten Genexpression, sondern auch an der Signalweiterleitung von Phytoprostanen beteiligt sind. Um ein umfassendes Bild über die Beteiligung der TGA-Transkriptionsfaktoren bei der PPA₁- bzw. OPDA-vermittelten Genexpression zu erhalten, wurde eine Transkriptionsanalyse in der TGA-Dreifach-Mutante nach Behandlung mit PPA₁ bzw. OPDA durchgeführt. Die Auswertung der Transkriptomanalyse zeigte, dass 60 Prozent der im Wildtyp durch PPA₁-vermittelten bzw. 30 Prozent der OPDA-vermittelten Genexpression in der TGA-Dreifach-Mutante nicht mehr induziert ist. Folglich deuten die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass PPA₁ und OPDA Teile eines überlappenden Signalweges sind.

Es wäre vorstellbar, dass durch steigende Konzentrationen von ROS die Biosynthese von freien oder membrangebundenen Phytoprostanen induziert wird. Die in Membranlipiden veresterten Phytoprostane könnten beispielsweise in Folge von Pathogenbefall durch Lipasen freigesetzt werden und als freie Phytoprostane verschiedene biologische Wirkungen vermitteln (THOMA *et al.*, 2003). Alternativ wäre es denkbar, dass Phytoprostane ihre TGA-vermittelte Wirkung über SA vermitteln. Es wäre durchaus möglich, dass Phytoprostane die Biosynthese von SA stimulieren und die Signalwirkung nicht direkt über die Phytoprostane vermittelt werden, sondern indirekt durch eine erhöhte SA-Konzentration ausgelöst wird. Um dies zu untersuchen, wurden *Arabidopsis thaliana* Blätter mit PPA₁ in einer Endkonzentration von 100 µM bzw. Methanol (Kontrolle) infiltriert und der SA-Gehalt nach zwei Stunden analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass PPA₁ die SA-Konzentration nicht stimulierte. Darüber hinaus wurde durch Zusatz von PPA₁ der SA-Gehalt in dem Blattgewebe von 4.40 ± 0.49 µg/g Trockengewicht in der Kontrolle auf 1.71 ± 0.15 µg/g Trockengewicht reduziert. Ob dies auf eine Hemmung der SA-Biosynthese zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht. Es

kann auf jeden Fall ausgeschlossen werden, dass die Behandlung von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit PPA₁ ihre TGA-vermittelte Aktivität über die Bildung von SA vermittelt. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis – wenn auch indirekt – überein, dass die Phytoprostan-vermittelte Genexpression ausgewählter Detoxifizierungs- und Stressgene über die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6, nicht aber über NPR1, dem zentralen Regulator SA-regulierter Reaktionen, gesteuert wird (Abbildung III.14). Folglich wird die Genexpression der getesteten Detoxifizierungs- und Stressgene nicht über NPR1 reguliert, was die Existenz weiterer interagierender Proteine bei der durch die TGA-Transkriptionsfaktoren vermittelten Genexpression vermuten lässt.

In einem weiteren Experiment sollten weitere Signaltransduktionskomponenten untersucht werden, die an der Phytoprostan-vermittelten Genexpression beteiligt sein könnten. FODE *et al.*, (2008) hat mittels Yeast-Two-Hybrid neben NPR1 einen weiteren TGA-Interaktionspartner identifiziert. Dabei konnte für das identifizierte SCL14-Protein ein positiver Effekt auf das *as-1*-Element nachgewiesen werden (FODE *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob dieses Protein ebenfalls an der Vermittlung der Phytoprostanantwort beteiligt ist, wurde die Genexpression nach Phytoprostanbehandlung in einer *sc14*-Überexprimierer(*SCL-OE*) und Verlustmutante (*SCL-KO*) untersucht. Die Expressionsanalysen der beiden *sc14*-Mutanten zeigten eine SCL14-abhängige Genexpression von *CYP81D11* und *GST25* (Abbildung III.14). Interessanterweise enthält der Promotorbereiche dieser beiden Gene ein *as-1*-ähnliches Element. Es wäre daher vorstellbar, dass das *as-1*-ähnliche Element im Promotorkontext eine entscheidende Rolle bei der SCL14-vermittelten Genexpression spielt.

Die SCL14-vermittelte Genexpression scheint jedoch nicht ausschließlich über ein *as-1*-ähnliches Element vermittelt zu sein, wie die Genexpressionsanalyse im Falle des Gens *GST6* beweist. *GST6*, das wie *CYP81D11* und *GST25* in seinem Promotorbereich ein *as-1*-ähnliches Element besitzt, weist ebenfalls einen erhöhten Expressionsspiegel in der *SCL-OE*-Mutante auf. Jedoch war der Expressionsspiegel in der Verlustmutante identisch zu dem in den Kontrollpflanzen (Abbildung III.14). Somit scheint es denkbar, dass zusätzlich zu SCL14 ein weiteres interagierendes Protein an der Signalweiterleitung der TGA-vermittelten Genexpression der Cyclopentenon-Oxylipine PPA₁ bzw. OPDA beteiligt ist.

IV.4 Metabolisierung der Phytoprostane

Der Gehalt von nicht-enzymatischen oxidierten Oxylipinen wie den Phytoprostanen steigt in *Arabidopsis thaliana* nach biotischem und abiotischem Stress an (THOMA *et al.*, 2003; GRUN, 2007). Eine Verringerung dieses Gehaltes wäre einerseits durch die Regulation der Freisetzung und andererseits durch Metabolisierung vorstellbar. So wurden in der Vergangenheit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie bereits Untersuchungen zur Metabolisierung von Phytoprostanen in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* durchgeführt (THOMA *et al.*, 2003). Die Konzentration des

zugesetzten PPB₁ im Medium der Zellkultur sank innerhalb von zwei Stunden von 3.5 µg/ml auf zwei Prozent des Ausgangswertes (0.5 µg/ml) und verblieb bis zum Ende des Versuchszeitraumes auf diesem niedrigen Niveau. Gleichzeitig konnte kein Anstieg der Phytoprostan- Konzentration in den Zellen festgestellt werden. Folglich weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Phytoprostane entweder unter dem Einfluss von extrazellulären Enzymen abgebaut oder in die Zellen aufgenommen und dort metabolisiert wurden.

Eine Möglichkeit der Metabolisierung von reaktiven Cyclopentenon Verbindungen ist die Reduktion dieser elektrophilen Verbindungen durch Oxidoreduktasen. So ist beispielsweise für OPDA bereits bekannt, dass die Oxidoreduktase OPR3 in *Arabidopsis thaliana* dieses Cyclopentenon zu OPC:8 katalysiert (SCHALLER *et al.*, 2000). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Oxylipine sehr häufig die Synthese von Proteinen induzieren, die an ihrer eigenen Biosynthese sowie der nachgeschalteten Signaltransduktion beteiligt sind (BUSEMAN *et al.*, 2006; DELKER *et al.*, 2006). Dadurch kann die Signalbildungskapazität beeinflusst und somit das Signal (und die Abwehrreaktion) reguliert werden. In einer Reihe von Experimenten konnte tatsächlich die oben beschriebene Hypothese teilweise bestätigt werden. Zunächst war es möglich, in einer durchgeführten Real-Time PCR Analyse zu zeigen, dass im Falle von PPA₁ bzw. OPDA die Expression der Oxidoreduktase OPR1 bzw. OPR3 induziert wurde (Abbildung III.14). Ferner konnte in anschließenden Untersuchungen nachgewiesen werden, dass das jeweilige Oxylipin (PPA₁ bzw. OPDA) als Substrat der jeweilig induzierten Oxidoreduktase (OPR1 bzw. OPR3) diene (Abbildung III.16). Somit scheinen die Oxylipine PPA₁ und OPDA die Expression von Genen, die an der Inaktivierung von reaktiven Molekülen beteiligt sein können, zu stimulieren.

Um zu überprüfen, ob die Signalbildungskapazität der Cyclopentenon-Oxylipine mit dem elektrophilen Charakter der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung zusammenhängt, wurde die Expressionsaktivität des *GST6*-Promotors nach Behandlung mit PPA₁ bzw. OPDA sowie deren, durch die über die jeweiligen Oxidoreduktasen reduzierte Form PPA₁-DH bzw. OPC:8, analysiert. Tatsächlich konnte eine durch die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung vermittelte Aktivierung des *GST6*-Promotors nachgewiesen werden (siehe Abbildung III.25). Die Cyclopentenon-Oxylipine PPA₁ bzw. OPDA stimulieren folglich ein Entgiftungssystem für elektrophile Moleküle und somit vermutlich auch ihren eigenen Metabolismus. Da viele der freigesetzten oxidierten Lipide wie die Cyclopentenon-Phytoprostane elektrophile Substanzen darstellen, ist eine schnelle Metabolisierung nötig, um vor Schäden dieser Substanzen zu schützen.

Ferner ist aus der Literatur bekannt, dass eine Induktion von Detoxifizierungsgenen („xenobiotische“ Reaktion) in *Arabidopsis thaliana* durch eine Vielzahl unterschiedlicher „xenobiotischer“ Substanzen, wie z.B. durch Barbiturate, Benzensulfonamide, Chlorophenole und weitere membrangängige

Substanzen, hervorgerufen werden kann (BAERSON *et al.*, 2005). Folglich scheint die Induktion von Genen aus den Phasen I bis III des Detoxifizierungsapparates durch eine Vielzahl unterschiedlicher „xenobiotischer“ Substanzen stimuliert zu werden (BAERSON *et al.*, 2005), um dadurch ihren eigenen Metabolismus regulieren zu können.

Die Untersuchung des Wachstums der *Arabidopsis thaliana tga2tga5tga6*-Mutanten sollte Aufschluss über eine mögliche Abhängigkeit einer Phytoprostan-Akkumulation auf die Metabolisierung dieser elektrophilen Substanzen geben, unter der Annahme, dass der Grad der Detoxifikation mit dem Gehalt der Phytoprostane korreliert. Tatsächlich zeigten sowohl die Transkriptomanalysen als auch die anschließenden Real-Time PCR Experimente, dass die Expression verschiedener Detoxifizierungs- und Stressgene in Abhängigkeit zu den Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 steht (Abbildung III.12). Sollten die TGA Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 tatsächlich an der Induktion von Phytoprostan metabolisierenden Enzymen beteiligt sein, wären Unterschiede im Wachstum von TGA-Dreifach Mutanten zu Wildtyp-Pflanzen zu erwarten. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Samen beider Pflanzen auf Phytoprostan-haltigem Medium kultiviert. Während das Wachstum, welches anhand der Wurzellänge bestimmt wurde, der Wildtyp-Samen auf Phytoprostan-haltigem Medium zu 50 Prozent gehemmt war, betrug die Wurzellänge der auskeimenden Samen der TGA-Dreifach Mutante auf diesem Medium im Vergleich zur Kontrollpflanze nur 14 Prozent. Ferner war im Falle der gewählten Kontrollbedingungen die Wurzellänge der TGA-Dreifach-Mutante im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen bereits zu 56 Prozent verkürzt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse - wenn auch indirekt – auf eine Beteiligung der TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 bei der Detoxifizierung elektrophiler Substanzen hin. Durch die Unterdrückung TGA-vermittelter Genexpression wird vermutlich eine toxische Konzentration elektrophiler Substanzen in den Samen bzw. den Wurzeln erreicht, die ein weiteres Wurzelwachstum verhindern. Somit stellt die Entgiftung der reaktiven, elektrophilen Oxylipine eine entscheidende Rolle bei dem oxidativen Stress dar.

Einen weiteren Metabolisierungsweg der Cyclopentenon Oxylipine könnte eine Konjugation an Glutathion darstellen. Vorstellbar wäre die Metabolisierung von Cyclopentenon-Oxylipinen analog zu der von Cyclopentenonen in Tieren. In Tieren werden Isoprostane A2 rasch durch Konjugation an Glutathion inaktiviert, die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert werden (CHEN *et al.*, 1999). Tatsächlich zeigte die Transkriptomanalyse nach PPA₁-Behandlung in der mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur, dass acht Glutathion-S-Transferasen mehr als dreifach durch PPA₁ induziert wurden. So konnte in Northern Blot Analysen gezeigt werden, dass die untersuchten Gene *GST6*, *GSTU17* und *GSTU25* sowohl durch PPA₁ als auch OPDA, jedoch nicht durch JA, induziert wurden (Abbildung III.2).

Aus der großen Anzahl an induzierten Glutathion-S-Transferasen war die GST6 aus mehreren Gesichtspunkten für weitere Experimente besonders interessant. So besitzt der Promotor mit dem *as-1*-Element ein putatives Erkennungsmotiv für TGA-Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus wird die GST6-Expression durch oxidierte Lipide induziert (Abbildung III.2) und katalysiert im Falle von PPA₁ und OPDA *in vitro* deren Metabolisierung (Abbildung III.18 und III.19). Ferner konnte für die GST6 als einzige Glutathion-S-Transferase der phi-Klasse eine Lokalisation im Chloroplasten nachgewiesen werden (FRISO *et al.*, 2004). Folglich könnte die GST6-vermittelte Metabolisierung der Cyclopentenon-Oxylipine bereits im Chloroplasten stattfinden, der aufgrund seines hohen Gehaltes an α -Linolensäure den Ort der Biosynthese für OPDA (DELKER *et al.*, 2006) und vermutlich anderer oxidierter Lipide darstellt. Erste Hinweise, dass die Bildung von Phytoprostanen auch in Membranlipiden stattfindet, lieferten Bestimmungen von F₁-Phytoprostanen in pflanzlichen Lipidfraktionen, die im Vergleich zu freien, nicht membranveresterten PPF₁ eine circa zehnfach höhere Konzentration von membranveresterten PPF₁ ergaben (GRUN, 2007).

In einer unabhängigen Arbeit von THATCHER *et al.*, (2007) konnte gezeigt werden, dass die GST6-Expression nicht auf ein Zellkompartiment beschränkt ist. Vielmehr existieren aufgrund von alternativen Transkriptionsstartpunkten zwei Proteinisoformen des GST6-Proteins, das je nach Stimulus sowohl im Cytosol als auch in den Chloroplasten lokalisiert sein kann. Die längere Version des GST6-Proteins besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die auf eine Lokalisation in den Plastiden hindeutet, was mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudie übereinstimmt (Abbildung III.23). Der kürzeren Proteinisoform fehlt hingegen diese Signalsequenz, was auf eine cytosolische Lokalisierung hindeutet. Real-Time PCR Analysen in zehn Tage alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zeigten, dass nach Stimulation durch die Cyclopentenon Oxylipine PPA₁ bzw. OPDA die kürzere Proteinisoform vermehrt transkribiert wird (Abbildung III.23). Dies deutet darauf hin, dass eine GST6-vermittelte Glutathion-Addition an die Cyclopentenon-Oxylipine möglicherweise vermehrt im Cytosol stattfindet.

In-vitro Untersuchungen bezüglich des Anteils von PPA₁ und OPDA bzw. ihren Glutathion-Addukten zeigten, dass die durch Inkubation mit rekombinantem GST6-Protein katalysierte Konjugation von Glutathion an PPA₁ bzw. OPDA nicht quantitativ ist (Abbildung III.21). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Glutathion-Konjugation, die zur Inaktivierung von Cyclopentenon Oxylipinen führt, eine reversible Gleichgewichtsreaktion ist. In durchgeführten Experimenten wurden etwa 40 Prozent der PPA₁- bzw. 74 Prozent der OPDA-Moleküle enzymatisch durch das GST6-Protein mit Glutathion inaktiviert. Diese Ergebnisse stimmen mit DUECKERSHOFF *et al.*, (2008) überein, die zeigten, dass der Anteil an unkonjugierten OPDA-Molekülen in enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionsansätzen in einem Phosphatpuffer (100 μ M) jeweils 26 Prozent beträgt (DUECKERSHOFF *et al.*,

2008). Somit scheinen sowohl der verwendete Phosphatpuffer als auch das GST6-Protein Enzym keinen entscheidenden Einfluss auf den Anteil der konjugierten Oxylin-Glutathion-Addukte zu haben und folglich auf die Konjugation von Glutathion an PPA₁ bzw. OPDA. Tatsächlich lassen diese Ergebnisse vermuten, dass in Gegenwart eines Glutathionüberschusses (1 mM) ein Teil der Cyclopentenon-Oxyline (20 bis 40 Prozent) *in vivo* in freier unkonjugierter Form vorkommt. Der Anteil dieser freien Cyclopentenon-Oxyline kann *in vivo* aufgrund der elektrophilen Eigenschaften nucleophil an Proteine binden. Die kovalente Bindung der Cyclopentenon-Oxyline findet bevorzugt an SH-Gruppen von Proteinen statt (FARMER and DAVOINE, 2007). Daher kann in der Oxylin-Protein-Bindung ein möglicher Wirkmechanismus der Cyclopentenon-Oxyline vermutet werden. Bei Inkubation von rekombinantem GST6-Protein mit einem Prostaglandin-A₁-Biotin-Konjugat (A₁-Phytoprostan bzw. OPDA-Analogon) konnte eine kovalente Modifikation mit nachfolgender Inaktivierung des GST6-Enzyms nachgewiesen werden (DUECKERSHOFF *et al.*, 2008). Das GST6-Protein ist somit nicht nur ein Enzym, dessen Expression durch oxidierte Lipide induziert wird und dessen Konjugation an Glutathion katalysiert, sondern auch ein putatives Target für Lipidierungen *in vivo*. Folglich zeigt dieses Beispiel, dass Lipidperoxydationsprodukte wie die A₁-Phytoprostane einerseits Detoxifizierungsreaktionen induzieren, andererseits aber auch aufgrund ihrer intrinsischen Reaktivität Proteine irreversibel schädigen können.

Zusammenfassend deuten die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass eine Pathogen-Infektion neben der Aktivierung des JA Biosyntheseweges zu einem „oxidativem burst“ und zur Bildung einer Vielzahl von elektrophilen Substanzen führt. Diese reaktiven elektrophilen Substanzen, zu denen unter anderem auch die Cyclopentenon-Oxyline gehören, führten zu einer erhöhten Expression von Detoxifizierungs- und Stressgenen, was zu einer erhöhten Bildung der Cyclopentenon-Addukte und anderen Lipid-Metaboliten führte. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung von DAVOINE *et al.*, (2006) überein, die belegt, dass eine Bildung von OPDA-Glutathion Addukten nach Infiltration mit Cryptogin mit einer erhöhten Expression von phi-Glutathion-S-Transferasen korreliert (DAVOINE *et al.*, 2006). Während im tierischen System die Bildung von Glutathion-Addukten meist eng mit der weiteren Metabolisierung und Ausscheidung verknüpft ist, ist die weitere Verstoffwechselung der Glutathion-Addukte in Pflanzen unbekannt. Allerdings lässt die hohe Anzahl induzierter ABC-Transporter vermuten, dass die Glutathion-Addukte in die Vakuolen transportiert und eingelagert werden.

V. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen der Oxylipine PPA₁ und OPDA untersucht. Diese vermutlich ubiquitär vorkommenden Cyclopentenone können durch verschiedene Stimuli, wie Peroxide oder Pathogenbefall, induziert werden. In der Folge induzieren sie ihrerseits die Expression von Genen der Detoxifizierung und Stressantwort in *Arabidopsis thaliana*. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Hypothese aufgestellt, nach der Phytoprostane Mediatoren von oxidativem Stress darstellen (MUELLER, 2004).

Um eine Funktion als Mediatoren von oxidativem Stress zu haben, müssen Phytoprostane nicht nur durch oxidativen Stress induziert werden, sondern auch eine biologische Wirkung besitzen.

So konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass in einer mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur das Cyclopentenon Oxylin PPA₁ neben Genen des Sekundärmetabolismus vermehrt die Expression von Genen der Detoxifizierung und Stressantwort induziert. Der anschließende Vergleich der PPA₁-vermittelten Geninduktion mit dem Genexpressionsprofil nach Pathogenbefall und anderen Stressfaktoren zeigte, dass ein Großteil der Gene, die durch PPA₁ mehr als dreifach induziert wurden, ebenfalls durch die Pathogene *Pseudomonas syringae* bzw. *Botrytis cinerea* sowie ROS induziert werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Pathogeninfektion und oxidativer Stress die Bildung von nicht-enzymatischen Oxylipinen fördern (GRUN, 2007). Darüber hinaus zeigte sich eine große Übereinstimmung des PPA₁-vermittelten Genexpressionsprofils mit den publizierten Daten für OPDA-responsive Gene. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der PPA₁-vermittelten Genexpression mit der durch JA-vermittelten Genexpression nur bei drei Prozent. Ferner ist aus der Literatur bekannt, dass die Induktion von Detoxifizierungs- und Stressgenen durch xenobiotische Substanzen wie Barbiturate induziert werden. Somit scheint es, dass reaktive elektrophile Cyclopentenone ein quantitativ ähnliches Cluster an Genen induzieren.

Um in Zukunft weitere, biologisch aktive Oxylipine zu identifizieren, wurden ausgehend von den Genexpressionsdaten Konstrukte für Reportergermlinien hergestellt. Als Reportergerm diente die Luciferase, die unter der Kontrolle von Oxylin-responsiven Promotoren (u.a. *OPR1* und *OPR3*) steht. So kann durch eine *in-vitro* Modelloxidation von Fettsäuren eine Mischung chemisch-oxidierter Lipide hergestellt werden, die nach chromatographischer Aufreinigung in einzelnen Fraktionen bezüglich ihrer biologischen Aktivität getestet werden können. Dazu werden zehn Tage alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen in Flüssigmedium herangezogen und mit den verschiedenen Oxylipinen behandelt. Mit Hilfe einer CCD-Kamera kann die Lumineszenz zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung gemessen werden. Fraktionen, die zu einer Erhöhung der Expressionsaktivität führen, können weiter aufgetrennt und quantitativ bedeutsame Substanzen identifiziert werden. Ihre

Struktur kann mittels NMR und MS aufgeklärt werden. In ersten Tests erwies sich das oben beschriebene Flüssigsystem mit Luciferase als Reportergen als sehr geeignet. So korrelierte die Expressionsaktivität einer *gst6::LUC* Reportergenlinie mit den Genexpressionsdaten.

Darüber hinaus konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass TGA-Transkriptionsfaktoren an der Signalweiterleitung der Phytoprostane beteiligt sind. Die Expression einiger PPA₁-responsiven Detoxifizierungs- und Stressgene war in der *Arabidopsis thaliana* TGA-Dreifach Mutante nicht mehr oder dramatisch verringert durch Phytoprostane induzierbar. Somit konnten mit den TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 drei für die Phytoprostanwirkung spezifische Signaltransduktionskomponenten identifiziert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die OPDA-vermittelte Genexpression ebenfalls teilweise über diese TGA-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Inwieweit JA ihre Wirkung gleichfalls über TGA2, TGA5 und TGA6 vermittelt, ist noch nicht geklärt. Allerdings zeigten Real-Time PCR Analysen, dass im Falle von JA die Genexpression des Gens *CYP81D11* auch in der TGA-Dreifach Mutante dramatisch verringert war (Abbildung III.10). Um jedoch im Detail zu verstehen, inwieweit JA seine Wirkung über die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 vermittelt und die Signalweiterleitung der Phytoprostane über das Signalprotein COI1 erfolgt, müssen weitere Microarray-Analysen durchgeführt werden. Microarray Analysen der *Arabidopsis thaliana coi1*- und der TGA-Dreifach-Mutante nach Phytoprostan Behandlung allgemein und JA-Behandlung im speziellen sollten dabei im Vordergrund stehen.

VI. Zusammenfassung

Die endogen in Pflanzen radikalisch gebildeten Phytoprostane regulieren in *Arabidopsis thaliana* eine Reihe von Genen, die an den Prozessen der Detoxifizierung und Zellproliferation beteiligt sind, während die externe Applikation dieser Oxylipine *in vitro* eine Akkumulation von sekundären Metaboliten, sogenannten Phytoalexinen, nach sich zieht. Ferner war aus vorherigen Arbeiten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie bekannt, dass die Vorbehandlung mit Phytoprostanen in *Arabidopsis thaliana* eine Schutzwirkung gegen nachfolgenden oxidativen Stress vermittelt. Neben nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen akkumulieren in höheren Pflanzen als Antwort auf einen oxidativen Stress auch enzymatisch gebildete Oxylipine wie 12-Oxophytodiensäure (OPDA) und Jasmonsäure (JA).

Als Ausgangspunkt zur systematischen Analyse der von einzelnen Phytoprostanen vermittelten Wirkspektren diente in der vorliegenden Arbeit eine Transkriptionsanalyse unter Verwendung einer mixotrophen *Arabidopsis thaliana* Zellkultur nach Phytoprostan-A₁ (PPA₁)-Behandlung. In weiterführenden Experimenten wurde das durch PPA₁-vermittelte Genexpressionsprofil mit dem Profil von weiteren, nicht-enzymatischen sowie dem durch die enzymatisch gebildeten Oxylipine OPDA bzw. JA hervorgerufenen Genexpressionsprofil verglichen. Die Vergleiche zeigten signifikante Übereinstimmungen, aber auch deutliche Unterschiede im Wirkprofil einzelner enzymatischer bzw. nicht-enzymatischer Oxylipine. Das Wirkungsspektrum der radikalisch gebildeten PPA₁ überschneidet sich zu 40 Prozent mit dem der enzymatisch gebildeten OPDA, jedoch nur zu sieben Prozent mit dem Wirkungsspektrum der ebenfalls enzymatisch gebildeten JA. Diese Beobachtung ließ einen über strukturelle Merkmale vermittelten Signalmechanismus vermuten, da die chemischen Strukturen von PPA₁ und OPDA, nicht jedoch PPA₁ und JA, verwandt sind. Zur Überprüfung der vorstehenden Hypothese wurden die Promotorbereiche der durch PPA₁ mehr als dreifach induzierten Gene bioinformatisch auf häufig vorhandene Sequenzmotive untersucht. Es zeigte sich, dass etwa die Hälfte der Promotorbereiche der durch PPA₁ induzierten Gene ein Bindungsmotiv für TGA-Transkriptionsfaktoren enthält. Nachfolgende Transkriptomanalysen in der TGA-Dreifach knockout *Arabidopsis thaliana* Mutante *tga2tga5tga6* zeigten, dass 60 Prozent der PPA₁- bzw. 30 Prozent der OPDA-vermittelten Genexpression durch die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 vermittelt werden.

Neben übereinstimmenden Wirkungen von PPA₁ und OPDA in der Genexpression sind in der Literatur überschneidende Wirkungen von OPDA und JA bezüglich einer Wurzelwachstumshemmung in *Arabidopsis thaliana* beschrieben. In Experimenten zur Untersuchung des Wurzelwachstums resultierte die exogene Applikation von JA bzw. OPDA auf *Arabidopsis thaliana* Samen in einer

Hemmung des Wurzelwachstums um 63 bzw. 72 Prozent. Dagegen vermittelte PPA₁ nur eine Hemmung um 50 Prozent.

Die vorstehend beschriebenen Wirkungen verschiedener Phytoprostane belegen ein umfassendes Wirkspektrum dieser heterogenen Substanzklasse. Neben den in vorliegender Arbeit im Vordergrund stehenden Phytoprostan-vermittelten Stressreaktionen sind eine Reihe physiologischer Prozesse, darunter das Wurzelwachstum, zumindest teilweise durch Phytoprostane reguliert.

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass mindestens zwei der durch Phytoprostane induzierten Gene Proteine kodieren, die effizient die Metabolisierung von Phytoprostanen fördern, um oxidativen Schäden vorzubeugen. Vermittelt werden die Phytoprostan-Wirkungen unter anderem durch die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6, welche zur Expression von Detoxifizierungs- und Stressgenen führen.

VII. Summary

Phytoprostanes that are endogenously and radically formed in higher plants regulate in *Arabidopsis thaliana* a number of genes that are involved in the processes of detoxification and cell proliferation. In contrast, the external application of these oxylipins results *in vitro* in the accumulation of secondary metabolites, so-called phytoalexins. Moreover, it was known from previous studies performed by the Chair for Pharmaceutical Biology that the pre-treatment with phytoprostanes in *Arabidopsis thaliana* leads to the protection against subsequent oxidative stress. In addition to non-enzymatically formed oxylipins, enzymatically formed oxylipins, such as 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) and jasmonic acid (JA) accumulate in higher plants as a consequence of oxidative stress.

The present dissertation uses a transcription analysis of an *Arabidopsis thaliana* mixotroph cell culture after treatment with phytoprostanane A₁ (PPA₁) as basis for the systematic analysis of the gene expression profile mediated by enzymatically and non-enzymatically formed oxylipins. Thus, in further experiments, the gene expression profile resulting from PPA₁ was compared with the gene expression profile of other non-enzymatically, i.e., PPB₁ and dPPJ₁ as well as the one of the enzymatically formed oxylipins, i.e., OPDA and JA, respectively. These comparisons showed significant consistencies but also considerable differences in the gene expression profile of certain enzymatic and non-enzymatic oxylipins. In 40 percent of all cases, the gene expression profile of radically catalyzed PPA₁ equals the one of enzymatically formed OPDA, but only in 7 percent of all cases, this gene expression profile is identical to the enzymatically catalyzed JA. This observation leads to the assumption of a signal mechanism resulting from structural characteristics, since the chemical structures of PPA₁ and OPDA are related to each other while PPA₁ and JA are not. In order to verify the above-mentioned hypothesis, the promoter regions of those genes which were more than three times induced were bioinformatically analysed for an abundance of specific binding sites. As a result, it turned out that approximately half of the promoter regions of the PPA₁-induced genes contained a binding site for TGA transcription factors. Subsequent transcription analyses in the TGA-triple knockout *Arabidopsis thaliana* mutant *tga2tga5tga6* showed that 60 percent of the PPA₁-induced and 30 percent of the OPDA-induced gene expression was mediated by the TGA transcription factors TGA2, TGA5 and TGA6.

In addition to the overlapping effect on gene expression described above, the literature describes an equal effect of OPDA and JA concerning the root growth inhibition in *Arabidopsis thaliana*. In experiments performed to evaluate the overall growth of the seedlings by JA or OPDA resulted in a 63 or 72 percent reduction of the root length in comparison to control plants. Rather to the contrary

the use of PPA₁ only resulted in a 50 percent reduction in comparison to *Arabidopsis thaliana* control plants.

Thus, the above mentioned effects of phytoprostanes demonstrate an extensive biological spectrum of these heterogenous types of substances. Apart from the phytoprostane-induced analysis of gene expression which is the crucial topic of this dissertation, a number of physiological processes, such as the root growth inhibition are at least in parts regulated by phytoprostanes.

Furthermore, the present dissertation shows for the first time that at least two of the phytoprostane-induced genes encode a protein that efficiently enhance the metabolism of phytoprostanes in order to prevent oxidative damages. The effects of phytoprostanes are inter alia mediated by the TGA transcription factors TGA2, TGA5 and TGA6 which result in the expression of detoxification and stress genes.

VIII. Literaturverzeichnis

- ALMERAS, E., STOLZ, S., VOLLENWEIDER, S., REYMOND, P., MENE-SAFFRANE, L., and FARMER, E.E. (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. *Plant J* **34**: 205-216.
- BAERSON, S.R., SANCHEZ-MOREIRAS, A., PEDROL-BONJOCH, N., SCHULZ, M., KAGAN, I.A., AGARWAL, A.K., REIGOSA, M.J., and DUKE, S.O. (2005). Detoxification and transcriptome response in Arabidopsis seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *J Biol Chem* **280**: 21867-21881.
- BAERTSCHI, S.W., INGRAM, C.D., HARRIS, T.M., and BRASH, A.R. (1988). Absolute configuration of cis-12-oxophytodienoic acid of flaxseed: implications for the mechanism of biosynthesis from the 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid. *Biochemistry* **27**: 18-24.
- BECKER, D., KEMPER, E., SCHELL, J., and MASTERSON, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* **20**: 1195-1197.
- BENFEY, P.N., REN, L., and CHUA, N.H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *Embo J* **8**: 2195-2202.
- BENJAMINI, Y., AND HOCHBERG, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodological)* **57**: 289-300.
- BLEE, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-322.
- BRASH, A.R., BAERTSCHI, S.W., INGRAM, C.D., and HARRIS, T.M. (1988). Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3382-3386.
- BREITHAUP, C., STRASSNER, J., BREITINGER, U., HUBER, R., MACHEROUX, P., SCHALLER, A., and CLAUSEN, T. (2001). X-ray structure of 12-oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. *Structure* **9**: 419-429.
- BUSEMAN, C.M., TAMURA, P., SPARKS, A.A., BAUGHMAN, E.J., MAATTA, S., ZHAO, J., ROTH, M.R., ESCH, S.W., SHAH, J., WILLIAMS, T.D., and WELTI, R. (2006). Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **142**: 28-39.
- CAO, H., GLAZEBROOK, J., CLARKE, J.D., VOLKO, S., and DONG, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57-63.
- CHEN, W., CHAO, G., and SINGH, K.B. (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* **10**: 955-966.
- CHEN, W., and SINGH, K.B. (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* **19**: 667-677.
- CHEN, Y., MORROW, J.D., and ROBERTS, L.J., 2ND. (1999). Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* **274**: 10863-10868.

- CHERN, M.S., FITZGERALD, H.A., YADAV, R.C., CANLAS, P.E., DONG, X., and RONALD, P.C.** (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J* **27**: 101-113.
- CHINI, A., FONSECA, S., FERNANDEZ, G., ADIE, B., CHICO, J.M., LORENZO, O., GARCIA-CASADO, G., LOPEZ-VIDRIERO, I., LOZANO, F.M., PONCE, M.R., MICOL, J.L., and SOLANO, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- COSTA, C.L., ARRUDA, P., and BENEDETTI, C.E.** (2000). An Arabidopsis gene induced by wounding functionally homologous to flavoprotein oxidoreductases. *Plant Mol Biol* **44**: 61-71.
- CRUZ CASTILLO, M., MARTINEZ, C., BUCHALA, A., METRAUX, J.P., and LEON, J.** (2004). Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**: 85-94.
- DATHE, W., RÖNSCH, H., PREISS, A., SCHADE, W., SEMBDNER, G., AND SCHREIBER, K.** (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535.
- DAVOINE, C., DOUKI, T., IACAZIO, G., MONTILLET, J.L., and TRIANTAPHYLIDES, C.** (2005). Conjugation of keto fatty acids to glutathione in plant tissues. Characterization and quantification by HPLC-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **77**: 7366-7372.
- DAVOINE, C., FALLETTI, O., DOUKI, T., IACAZIO, G., ENNAR, N., MONTILLET, J.L., and TRIANTAPHYLIDES, C.** (2006). Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol* **140**: 1484-1493.
- DELKER, C., STENZEL, I., HAUSE, B., MIERSCH, O., FEUSSNER, I., and WASTERNAK, C.** (2006). Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 297-306.
- DESPRES, C., CHUBAK, C., ROCHON, A., CLARK, R., BETHUNE, T., DESVEAUX, D., and FOBERT, P.R.** (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181-2191.
- DESPRES, C., DELONG, C., GLAZE, S., LIU, E., and FOBERT, P.R.** (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279-290.
- DEVOTO, A., ELLIS, C., MAGUSIN, A., CHANG, H.S., CHILCOTT, C., ZHU, T., and TURNER, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**: 497-513.
- DEVOTO, A., NIETO-ROSTRO, M., XIE, D., ELLIS, C., HARMSTON, R., PATRICK, E., DAVIS, J., SHERRATT, L., COLEMAN, M., and TURNER, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J* **32**: 457-466.
- DEVOTO, A., and TURNER, J.G.** (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis. *Ann Bot (Lond)* **92**: 329-337.
- DHARMASIRI, N., DHARMASIRI, S., and ESTELLE, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.

- DUECKERSHOFF, K., MUELLER, S., MUELLER, M.J., and REINDERS, J.** (2008). Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 1975-1985.
- ELLIS, C., and TURNER, J.G.** (2002). A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**: 549-556.
- ELLIS, J.G., TOKUHISA, J.G., LLEWELLYN, D.J., BOUCHEZ, D., SINGH, K., DENNIS, E.S., and PEACOCK, W.J.** (1993). Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant J* **4**: 433-443.
- FALCONE, D.L., OGAS, J.P., and SOMERVILLE, C.R.** (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* **4**: 17.
- FAN, W., and DONG, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1377-1389.
- FARMER, E.E., ALMERAS, E., and KRISHNAMURTHY, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 372-378.
- FARMER, E.E., and DAVOINE, C.** (2007). Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 380-386.
- FEUSSNER, I., and WASTERNAK, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297.
- FEYS, B., BENEDETTI, C.E., PENFOLD, C.N., and TURNER, J.G.** (1994). *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- FODE, B., SIEMSEN, T., THUROW, C., WEIGEL, R., and GATZ, C.** (2008). The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *Plant Cell* **20**: 3122-3135.
- FRISO, G., GIACOMELLI, L., YTTERBERG, A.J., PELTIER, J.B., RUDELLA, A., SUN, Q., and WIJK, K.J.** (2004). In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **16**: 478-499.
- FROELICH, J.E., WILKERSON, C.G., RAY, W.K., MCANDREW, R.S., OSTERYOUNG, K.W., GAGE, D.A., and PHINNEY, B.S.** (2003). Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* **2**: 413-425.
- GIDDA, S.K., MIERSCH, O., LEVITIN, A., SCHMIDT, J., WASTERNAK, C., and VARIN, L.** (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**: 17895-17900.
- GRUN, C., BERGER, S., MATTHES, D. AND MUELLER, M.J.** (2007). Early accumulation of non-enzymatically synthesised oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Functional Plant Biology* **34**: 65-71.
- HAMBERG, M.** (1988). Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: identification of an allene oxide cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **156**: 543-550.
- HYUN, Y., CHOI, S., HWANG, H.J., YU, J., NAM, S.J., KO, J., PARK, J.Y., SEO, Y.S., KIM, E.Y., RYU, S.B., KIM, W.T., LEE, Y.H., KANG, H., and LEE, I.** (2008). Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev Cell* **14**: 183-192.

- IKEGAMI, S., TAGUCHI, T., OHASHI, M., OGURO, M., NAGANO, H., and MANO, Y.** (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* **275**: 458-460.
- IMBUSCH, R., MUELLER, M. J.** (2000). Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from α -linolenic acid in plants. *Free Rad Biol Med* **28**: 720-726.
- ISHIGURO, S., KAWAI-ODA, A., UEDA, J., NISHIDA, I., and OKADA, K.** (2001). The DEFECTIVE IN ANTHIER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2191-2209.
- JAKOBY, M., WEISSHAAR, B., DROGE-LASER, W., VICENTE-CARBAJOSA, J., TIEDEMANN, J., KROJ, T., and PARCY, F.** (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**: 106-111.
- JOHNSON, C., BODEN, E., and ARIAS, J.** (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1846-1858.
- KADOTA, Y., WATANABE, T., FUJII, S., HIGASHI, K., SANO, T., NAGATA, T., HASEZAWA, S., and KUCHITSU, K.** (2004). Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J* **40**: 131-142.
- KATAGIRI, F., LAM, E., and CHUA, N.H.** (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* **340**: 727-730.
- KATSIR, L., CHUNG, H.S., KOO, A.J., and HOWE, G.A.** (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 428-435.
- KESARWANI, M., YOO, J., and DONG, X.** (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**: 336-346.
- KINKEMA, M., FAN, W., and DONG, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**: 2339-2350.
- KOCH, T., BANDEMER, K. AND BOLAND, W.** (1997). Biosynthesis of *cis*-jasmonate: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helvetica Chimica Acta* **80**: 838-850.
- KODA, Y., KIKUTA, Y., TAZAKI, H., TSUJINO, Y., SAKAMURA, S. AND YOSHIHARA T.** (1991). Potato tuber inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**: 1435-1438.
- KRAMELL, R., MIERSCH, O., HAUSE, B., ORTEL, B., PARTHIER, B., and WASTERNAK, C.** (1997). Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett* **414**: 197-202.
- KRAWCZYK, S., THUROW, C., NIGGEWEG, R., and GATZ, C.** (2002). Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res* **30**: 775-781.
- KRISCHKE, M., LOEFFLER, C., and MUELLER, M.J.** (2003). Biosynthesis of 14,15-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones via the phytoprostane D(1) pathway. *Phytochemistry* **62**: 351-358.
- LANDSCHULZ, W.H., JOHNSON, P.F., and MCKNIGHT, S.L.** (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.

- LAUDERT, D., and WEILER, E.W.** (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* **15**: 675-684.
- LEÓN, J., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.** (1999). Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 373-380.
- LEVITT, J.** (1980). Responses of plants to environmental stresses. (Acad. Press, New York).
- LI, C., SCHILMILLER, A.L., LIU, G., LEE, G.I., JAYANTY, S., SAGEMAN, C., VREBALOV, J., GIOVANNONI, J.J., YAGI, K., KOBAYASHI, Y., and HOWE, G.A.** (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* **17**: 971-986.
- LI, X., ZHANG, Y., CLARKE, J.D., LI, Y., and DONG, X.** (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, *SNI1*, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**: 329-339.
- LIECHTI, R., and FARMER, E.E.** (2002). The jasmonate pathway. *Science* **296**: 1649-1650.
- LOEFFLER, C., BERGER, S., GUY, A., DURAND, T., BRINGMANN, G., DREYER, M., VON RAD, U., DURNER, J., and MUELLER, M.J.** (2005). B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* **137**: 328-340.
- LORENZO, O., CHICO, J.M., SANCHEZ-SERRANO, J.J., and SOLANO, R.** (2004). *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938-1950.
- MCCONN, M., CREELMAN, R.A., BELL, E., MULLET, J.E., and BROWSE, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5473-5477.
- MOONS, A.** (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm* **72**: 155-202.
- MORROW, J.D., HILL, K.E., BURK, R.F., NAMMOUR, T.M., BADR, K.F., and ROBERTS, L.J., 2ND.** (1990). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9383-9387.
- MOU, Z., FAN, W., and DONG, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944.
- MUCKENSCHNABEL, I., GOODMAN, B.A., WILLIAMSON, B., LYON, G.D., and DEIGHTON, N.** (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J Exp Bot* **53**: 207-214.
- MUELLER, M.J.** (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant* **100**: 653-663.
- MUELLER, M.J.** (1998). Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem Biol* **5**: 323-333.
- MUELLER, M.J.** (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 441-448.
- MUELLER, M.J., BRODSCHMELM, W., SPANNAGL, E., and ZENK, M.H.** (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7490-7494.
- MULLIS, K.B., and FALOONA, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

- MÜSSIG C., B.C., LISSO, J., UWER U., WEILER E.W., ALTMANN, T. (2000). A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *J Plant Physiol* **157**: 143-152.
- NAGATA, T., UEHARA, Y., NUMABE, A., ISHIMITSU, T., HIRAWA, N., IKEDA, T., MATSUOKA, H., and SUGIMOTO, T. (1992). Regulatory effect of thromboxane A₂ on proliferation of vascular smooth muscle cells from rats. *Am J Physiol* **263**: H1331-1338.
- NARVAÉZ-VÁSQUEZ, J., FLORIN-SCHRISTENSEN, J., RYAN, C.A. . (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: 2249-2260.
- NEUHAUS, G., NEUHAUS-URL, G., KATAGIRI, F., SEIPEL, K., and CHUA, N.H. (1994). Tissue-Specific Expression of as-1 in Transgenic Tobacco. *Plant Cell* **6**: 827-834.
- NORMANLY, J. (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant* **100**: 431-442.
- PARCHMANN, S., GUNDLACH, H., and MUELLER, M.J. (1997). Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* **115**: 1057-1064.
- PARCHMANN, S., and MUELLER, M.J. (1998). Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants. *J Biol Chem* **273**: 32650-32655.
- PASCUZZI, P., HAMILTON, D., BODILY, K., and ARIAS, J. (1998). Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J Biol Chem* **273**: 26631-26637.
- PAUWELS, L., MORREEL, K., DE WITTE, E., LAMMERTYN, F., VAN MONTAGU, M., BOERJAN, W., INZE, D., and GOOSSENS, A. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1380-1385.
- PENNINCKX, I.A., EGGERMONT, K., TERRAS, F.R., THOMMA, B.P., DE SAMBLANX, G.W., BUCHALA, A., METRAUX, J.P., MANNERS, J.M., and BROEKAERT, W.F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- REYMOND, P., WEBER, H., DAMOND, M., and FARMER, E.E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-720.
- RIBOT, C., ZIMMERLI, C., FARMER, E.E., REYMOND, P., and POIRIER, Y. (2008). Induction of the *Arabidopsis* PHO1;H10 Gene by 12-Oxo-Phytodienoic Acid But Not Jasmonic Acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-Dependent Pathway. *Plant Physiol* **147**: 696-706.
- RYALS, J., WEYMANN, K., LAWTON, K., FRIEDRICH, L., ELLIS, D., STEINER, H.Y., JOHNSON, J., DELANEY, T.P., JESSE, T., VOS, P., and UKNES, S. (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* **9**: 425-439.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- SASAKI-SEKIMOTO, Y., TAKI, N., OBAYASHI, T., AONO, M., MATSUMOTO, F., SAKURAI, N., SUZUKI, H., HIRAI, M.Y., NOJI, M., SAITO, K., MASUDA, T., TAKAMIYA, K., SHIBATA, D., and OHTA, H. (2005). Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **44**: 653-668.

- SATTLER, S.E., GILLILAND, L.U., MAGALLANES-LUNDBACK, M., POLLARD, M., and DELLAPENNA, D.** (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419-1432.
- SATTLER, S.E., MENE-SAFFRANE, L., FARMER, E.E., KRISCHKE, M., MUELLER, M.J., and DELLAPENNA, D.** (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* **18**: 3706-3720.
- SCHALLER, F.** (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot* **52**: 11-23.
- SCHALLER, F., BIESGEN, C., MUSSIG, C., ALTMANN, T., and WEILER, E.W.** (2000). 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984.
- SCHALLER, F., HENNIG, P., and WEILER, E.W.** (1998). 12-Oxophytodienoate-10,11-reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid. *Plant Physiol* **118**: 1345-1351.
- SCHALLER, F., and WEILER, E.W.** (1997). Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*. Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme. *J Biol Chem* **272**: 28066-28072.
- SCHILLMILLER, A.L., and HOWE, G.A.** (2005). Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 369-377.
- SEMBDNER, G.A.P., B. .** (1993). The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 569-589
- SEO, H.S., SONG, J.T., CHEONG, J.J., LEE, Y.H., LEE, Y.W., HWANG, I., LEE, J.S., and CHOI, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4788-4793.
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., and MAIZEL, J.V., JR.** (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**: 815-820.
- SMITH, C.S., ZAPLACHINSKI, S.T., MUENCH, D.G., and MOORHEAD, G.B.** (2002). Expression and purification of the chloroplast putative nitrogen sensor, PII, of *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr Purif* **25**: 342-347.
- SOUTHERN, M.M., BROWN, P.E., and HALL, A.** (2006). Luciferases as reporter genes. *Methods Mol Biol* **323**: 293-305.
- STASWICK, P.E., and TIRYAKI, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- STASWICK, P.E., TIRYAKI, I., and ROWE, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- STINTZI, A., and BROWSE, J.** (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10625-10630.

- STINTZI, A., WEBER, H., REYMOND, P., BROWSE, J., and FARMER, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12837-12842.
- STRASSNER, J., SCHALLER, F., FRICK, U.B., HOWE, G.A., WEILER, E.W., AMRHEIN, N., MACHEROUX, P., and SCHALLER, A.** (2002). Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J* **32**: 585-601.
- STRAUS, D.S., and GLASS, C.K.** (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* **21**: 185-210.
- STUHLFELDER, C., MUELLER, M.J., and WARZECHA, H.** (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur J Biochem* **271**: 2976-2983.
- SWIATEK, A., LENJOU, M., VAN BOCKSTAELE, D., INZE, D., and VAN ONCKELEN, H.** (2002). Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **128**: 201-211.
- SWIATEK, A., VAN DONGEN, W., ESMANS, E.L., and VAN ONCKELEN, H.** (2004). Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiol* **135**: 161-172.
- SZYROKI, A., IVASHIKINA, N., DIETRICH, P., ROELFSEMA, M.R., ACHE, P., REINTANZ, B., DEEKEN, R., GODDE, M., FELLE, H., STEINMEYER, R., PALME, K., and HEDRICH, R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2917-2921.
- TAKI, N., SASAKI-SEKIMOTO, Y., OBAYASHI, T., KIKUTA, A., KOBAYASHI, K., AINAI, T., YAGI, K., SAKURAI, N., SUZUKI, H., MASUDA, T., TAKAMIYA, K., SHIBATA, D., KOBAYASHI, Y., and OHTA, H.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 1268-1283.
- THATCHER, L.F., CARRIE, C., ANDERSSON, C.R., SIVASITHAMPARAM, K., WHELAN, J., and SINGH, K.B.** (2007). Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J Biol Chem* **282**: 28915-28928.
- THIMM, O., BLASING, O., GIBON, Y., NAGEL, A., MEYER, S., KRUGER, P., SELBIG, J., MULLER, L.A., RHEE, S.Y., and STITT, M.** (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**: 914-939.
- THINES, B., KATSIR, L., MELOTTO, M., NIU, Y., MANDAOKAR, A., LIU, G., NOMURA, K., HE, S.Y., HOWE, G.A., and BROWSE, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665.
- THOMA, I., LOEFFLER, C., SINHA, A.K., GUPTA, M., KRISCHKE, M., STEFFAN, B., ROITSCH, T., and MUELLER, M.J.** (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* **34**: 363-375.
- THOMMA, B.P., EGGERMONT, K., PENNINGCKX, I.A., MAUCH-MANI, B., VOGELSANG, R., CAMMUE, B.P., and BROEKAERT, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15107-15111.
- TURNER, J.G., ELLIS, C., and DEVOTO, A.** (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **14 Suppl**: S153-164.

- UQUILLAS, C., LETELIER, I., BLANCO, F., JORDANA, X., and HOLUIGUE, L.** (2004).NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 34-42.
- USADEL, B., NAGEL, A., THIMM, O., REDESTIG, H., BLAESING, O.E., PALACIOS-ROJAS, N., SELBIG, J., HANNEMANN, J., PIQUES, M.C., STEINHAUSER, D., SCHEIBLE, W.R., GIBON, Y., MORCUENDE, R., WEICHT, D., MEYER, S., and STITT, M.** (2005).Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol* **138**: 1195-1204.
- VELLOSILLO, T., MARTINEZ, M., LOPEZ, M.A., VICENTE, J., CASCON, T., DOLAN, L., HAMBERG, M., and CASTRESANA, C.** (2007).Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831-846.
- VICK, B.A., and ZIMMERMAN, D.C.** (1983).The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 470-477.
- VIJAYAN, P., SHOCKEY, J., LEVESQUE, C.A., COOK, R.J., and BROWSE, J.** (1998).A role for jasmonate in pathogen defense of arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7209-7214.
- VINSON, C.R., SIGLER, P.B., and MCKNIGHT, S.L.** (1989).Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**: 911-916.
- VOLLENWEIDER, S., WEBER, H., STOLZ, S., CHETELAT, A., and FARMER, E.E.** (2000).Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J* **24**: 467-476.
- VRANOVA, E., INZE, D., and VAN BREUSEGEM, F.** (2002).Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* **53**: 1227-1236.
- WANG, C., ZIEN, C.A., AFITLHILE, M., WELTI, R., HILDEBRAND, D.F., and WANG, X.** (2000).Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 2237-2246.
- WASTERNAK, C.** (2007).Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot (Lond)*.
- WEBER, H.** (2002).Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 217-224.
- WEILER, E.W., LAUDERT, D., SCHALLER F., STELMACH, B., HENNIG P.** (1998). Fatty acid-derived signal molecules in the interction of plants wih their environment. (Plenum Press, New York: Romeo, J.T. et al.).
- WU, Z., IRIZARRY, R.A., GENTLEMAN, R., MURILLO, F.M., AND SPENCER, F.** (2003).A Model Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. (Baltimore, MD: Johns Hopkins University).
- XIANG, C., MIAO, Z., and LAM, E.** (1997).DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **34**: 403-415.
- XIE, D.X., FEYS, B.F., JAMES, S., NIETO-ROSTRO, M., and TURNER, J.G.** (1998).COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094.

- XU, L., LIU, F., LECHNER, E., GENSHIK, P., CROSBY, W.L., MA, H., PENG, W., HUANG, D., and XIE, D.** (2002).The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1919-1935.
- YAENO, T., MATSUDA, O., and IBA, K.** (2004).Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J* **40**: 931-941.
- ZHANG, Y., FAN, W., KINKEMA, M., Li, X., and DONG, X.** (1999).Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6523-6528.
- ZHANG, Y., TESSARO, M.J., LASSNER, M., and Li, X.** (2003).Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**: 2647-2653.
- ZHOU, J.M., TRIFA, Y., SILVA, H., PONTIER, D., LAM, E., SHAH, J., and KLESSIG, D.F.** (2000).NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 191-202.
- ZIMMERMANN, P., HIRSCH-HOFFMANN, M., HENNIG, L., and GRUISSEM, W.** (2004).GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**: 2621-2632.

IX. Anhang

Abbildung 1

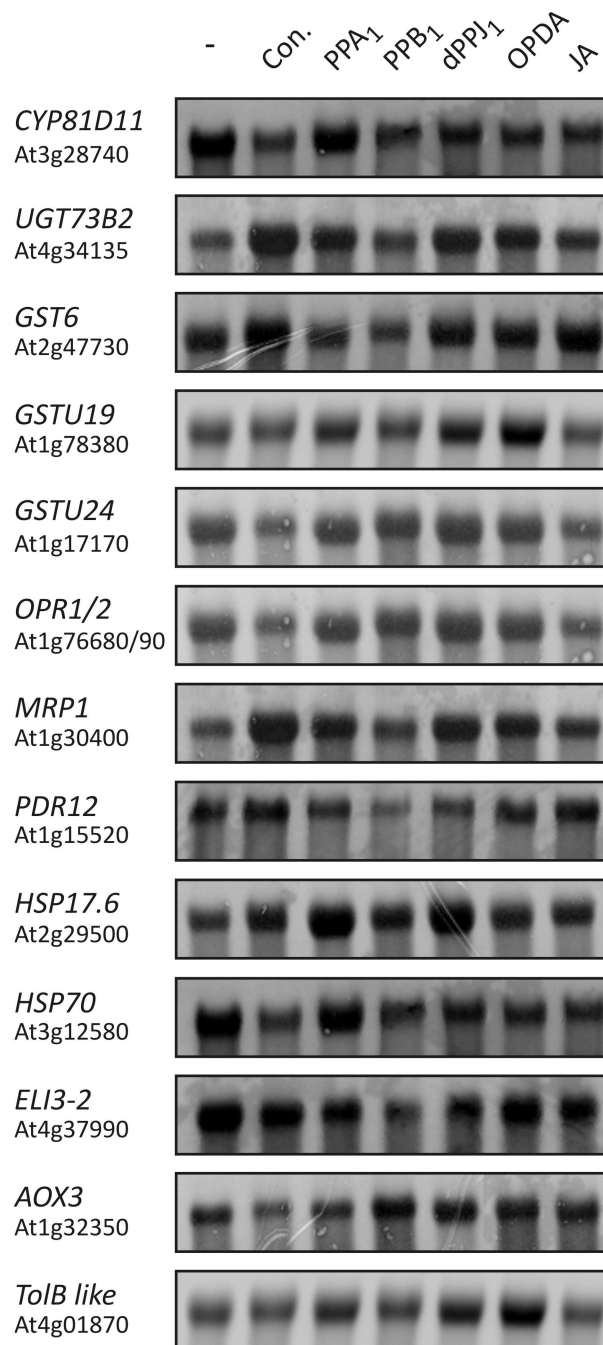
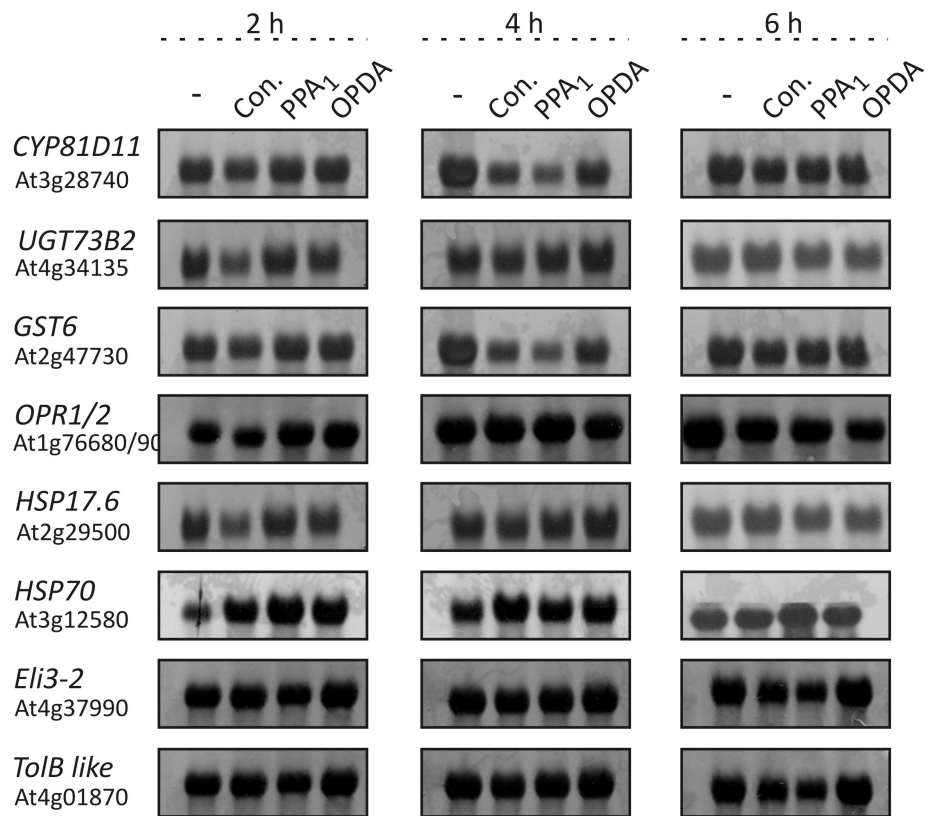
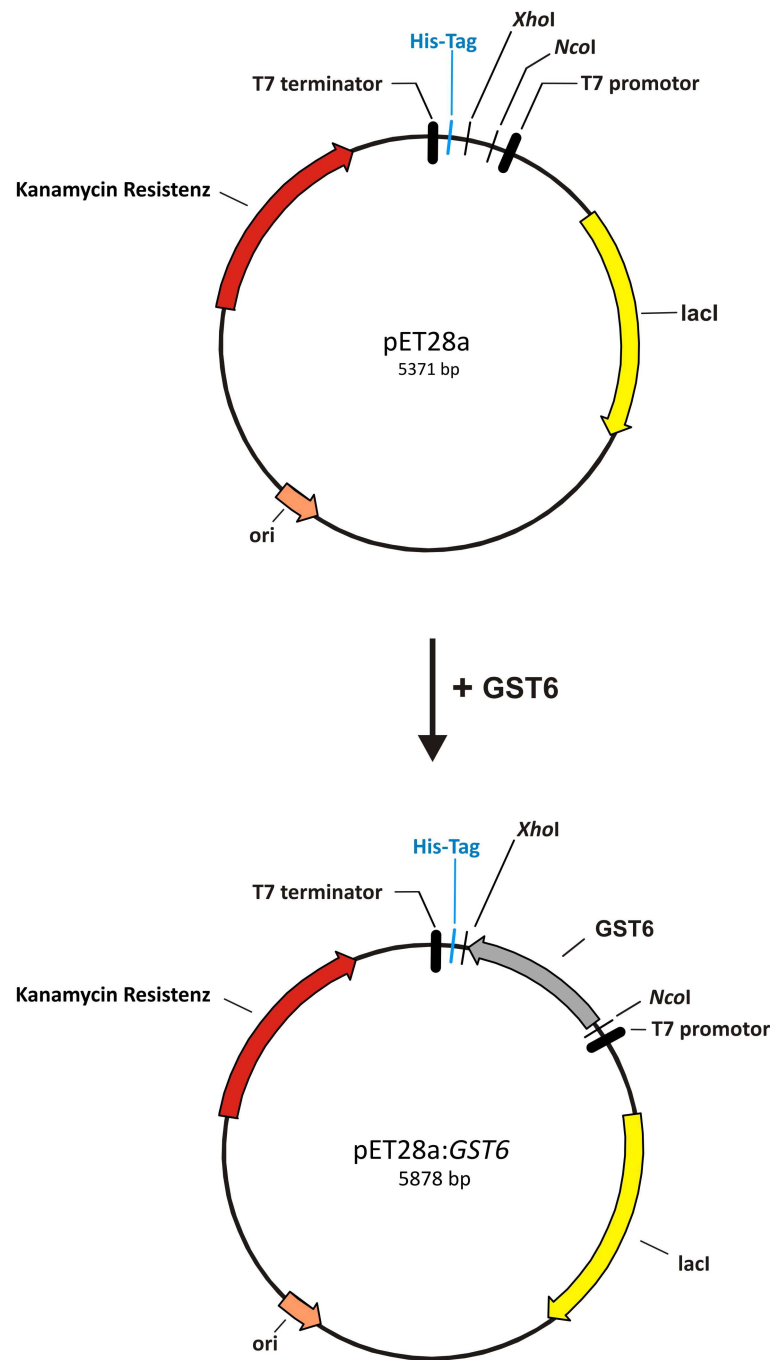


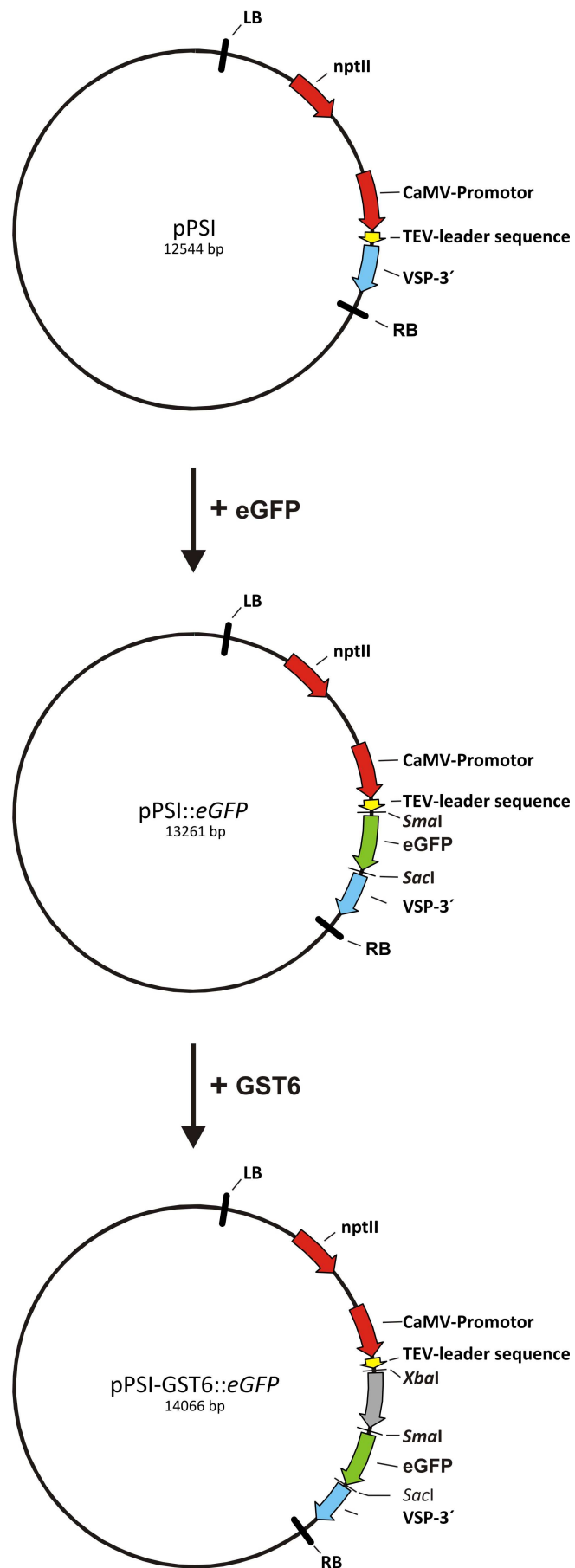
Abbildung 2



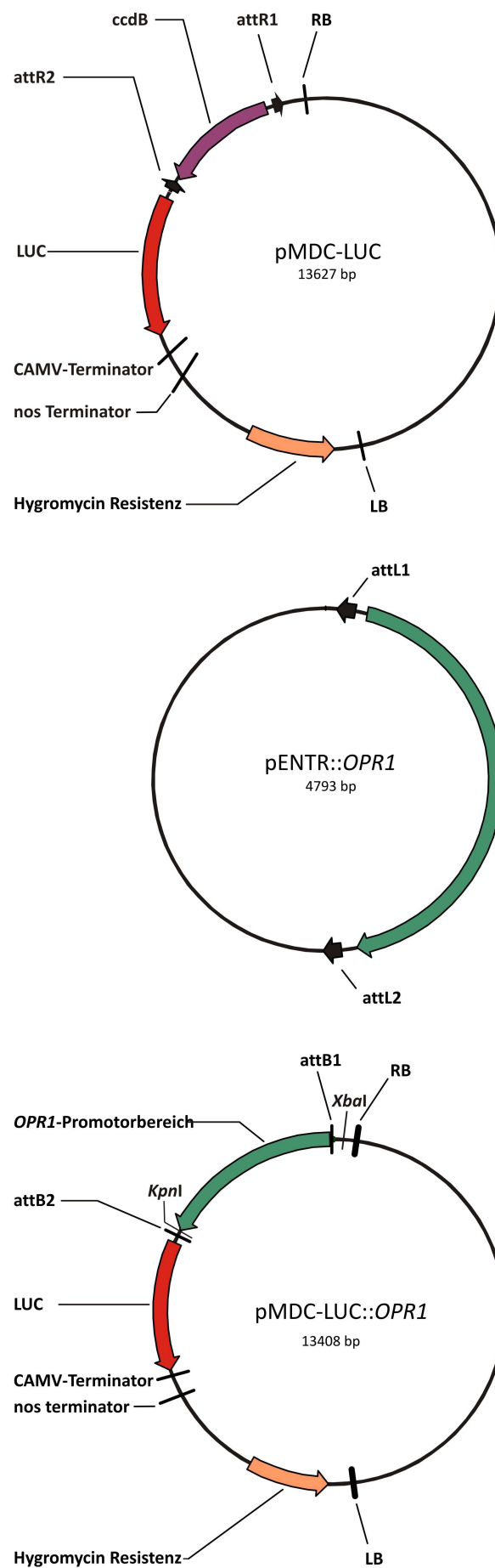
Vektorkarte 1



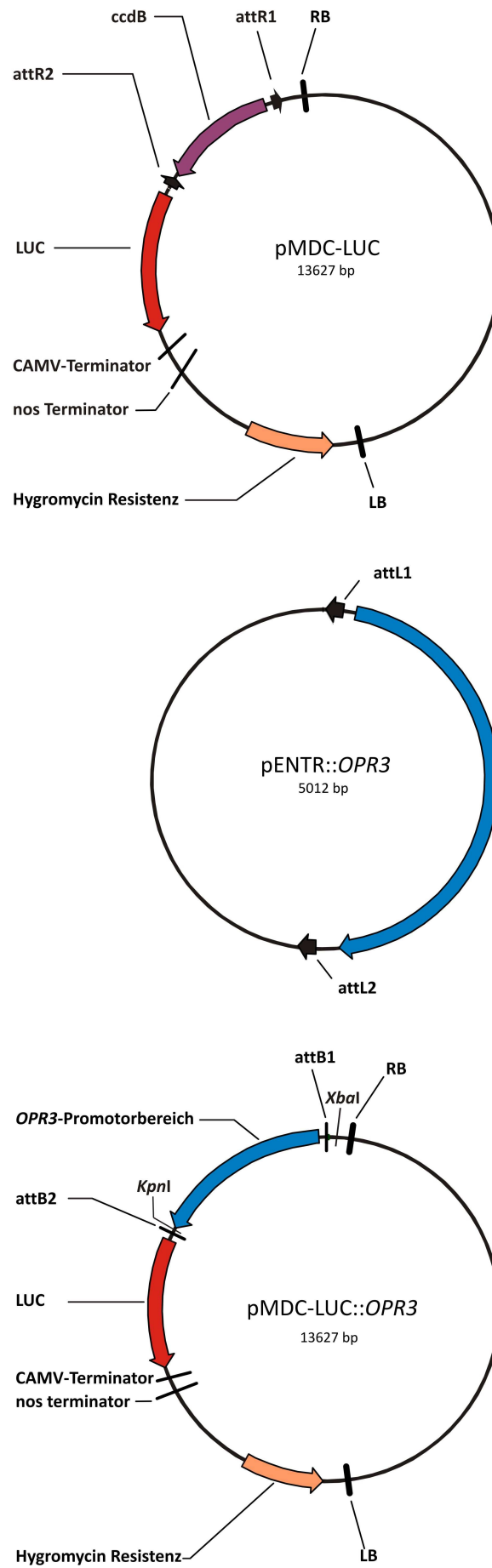
Vektorkarte 2



Vektorkarte 3



Vektorkarte 4



X. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stefan Müller
Geburtsdatum: 04.09.1979
Geburtsort: Ulm
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1986 - 1990 Grundschule Beimerstetten
1990 - 1999 Kepler Gymnasium Ulm

Hochschulstudium

2000 - 2005 Biologiestudium an der Julius Maximilians Universität Würzburg

03 - 12/2005 Diplomarbeit mit dem Titel „Funktionelle Analyse der reversiblen Methylierung der Jasmonsäure“, angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Julius Maximilians Universität Würzburg

Promotion

2006 - 09/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Professor Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Julius Maximilians Universität Würzburg.

seit 10/2008 Patentsachbearbeiter bei der Patentanwaltskanzlei Vossius und Partner, München

XI. Teile der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in folgenden Veröffentlichungen:

Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S., General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 768-785 (2008).

Dueckershoff, K., Mueller, S., Mueller, M.J., and Reinders, J., Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 1975-1985 (2008).

Vortrag:

Mueller, S. und Mueller M.J., "Global gene regulation by oxidized lipids (phytoprostanes) in *Arabidopsis*" auf dem Kongreß "RoS in Plants 2007" - 12.-14.09.2007 - Ghent, Belgien

Posterpräsentation:

Mueller, S., Mueller, M.J., und Berger, S., "Global gene regulation by oxidized lipids (phytoprostanes) in *Arabidopsis*" auf dem Kongreß "The European Plant Biology Congress - FESPB 2008" - 17.-23.08.2008 - Tampere, Finnland

XII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Martin J. Mueller für die Überlassung dieses überaus interessanten und vielseitigen Themas, sowie für die Betreuung und Unterstützung.

Frau Privatdozentin Dr. Susanne Berger danke ich für hilfreiche Tipps bei der Anfertigung dieser Dissertation sowie für das Korrekturlesen.

Herrn Professor Dr. Thomas Müller danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Markus Krischke danke ich für die HPLC-MS/MS Messungen sowie seiner Kooperationsbereitschaft.

Bei Frau Professor Dr. Christiane Gatz bedanke ich mich für die Kooperation bei der Untersuchung der TGA-Transkriptionsfaktoren bei der Phytoprostan-vermittelten Signalweiterleitung.

Mein Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft. Hierbei möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. Heribert Warzecha, Nadja Stingl, Beate Stephan, Markus Peer, Maria Zöller, Kristina Haslinger, Carmen Heckel, sowie der Real-Time PCR Truppe von Dr. Peter Ache, Lehrstuhl für Botanik I bedanken.

Den Mitarbeitern des Botanischen Gartens, insbesondere dem Gärtner meines Vertrauens, Herrn Joachim Rothenhöfer danke ich für die gute Versorgung der Versuchspflanzen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, insbesondere dem Sonderforschungsbereich 567, sowie dem Graduiertenkolleg 1342 „Lipid Signalling“ sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Mein liebevollster Dank gilt meiner Freundin Sabine Schulz für die endlose Geduld und die unermüdliche Unterstützung – Danke mein Schatz ohne dich hätte ich es nie geschafft! Weiterhin möchte ich mich bei Marita Schulz für das Korrekturlesen bedanken. Abschließend geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, meinen Bruder sowie meine Großmutter. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen.

XIII. Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

München, den

.....

Stefan Müller